

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN  
SENYAWA AKTIF EKSTRAK KULIT DAHAN  
SIRSAK (*Annona muricata* Linn) TERHADAP  
LARVA UDANG *Artemia salina* Leach**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**ANADIYATUL ULFA**  
**NIM. 09630048**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2014**

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN  
SENYAWA AKTIF EKSTRAK KULIT DAHAN  
SIRSAK (*Annona muricata* Linn) TERHADAP  
LARVA UDANG *Artemia salina* Leach**

**SKRIPSI**

**Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri  
Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)**

**Oleh:  
ANADIYATUL ULFA  
NIM. 09630048**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2014**

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN  
SENYAWA AKTIF EKSTRAK KULIT DAHAN  
SIRSAK (*Annona muricata* Linn) TERHADAP  
LARVA UDANG *Artemia salina* Leach**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
ANADIYATUL ULFA  
NIM. 09630048**

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:  
Tanggal: 16 Januari 2014

Pembimbing I,

Pembimbing II,

  
Elok Kamilah Hayati, M. Si  
NIP. 19790620 200604 2 002

  
Dr. H. Munirul Abidin, M. Ag  
NIP. 19720420 200212 1 003

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia



Elok Kamilah Hayati, M. Si  
NIP. 19790620 200604 2 002

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN  
SENYAWA AKTIF EKSTRAK KULIT DAHAN  
SIRSAK (*Annona muricata* Linn) TERHADAP  
LARVA UDANG *Artemia salina* Leach**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
ANADIYATUL ULFA  
NIM. 09630048**

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 16 Januari 2014

**Susunan Dewan Penguji:**

Penguji Utama	Diana Candra Dewi, M. Si NIP. 19770720 200312 2 001	(.....)
Ketua Penguji	Hafidatul Hasanah, M. Si LB. 64108	(.....)
Sekretaris Penguji	Elok Kamilah Hayati, M. Si NIP. 19790620 200604 2 002	(.....)
Anggota Penguji	Dr. H. Munirul Abidin, M. Ag NIP. 19720420 200212 1 003	(.....)

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia



**Elok Kamilah Hayati, M. Si  
NIP. 19790620 200604 2 002**

## HALAMAN MOTTO

وَلَوْ أَنَّمَا فِي الْأَرْضِ مِنْ شَجَرَةٍ أَقْلَمٌ وَالْبَحْرُ يَمُدُّهُ مِنْ بَعْدِهِ

سَبْعَةُ أَنْحَرٍ مَا نَفِدَتْ كَلِمَاتُ اللَّهِ إِنَّ اللَّهَ عَزِيزٌ حَكِيمٌ

*“Dan seandainya pohon-pohon di bumi menjadi pena dan laut (menjadi tinta), ditambahkan kepadanya tujuh laut (lagi) sesudah (kering)nya, niscaya tidak akan habis-habisnya (dituliskan) kalimat Allah. Sesungguhnya Allah Maha Perkasa lagi Maha Bijaksana.”*  
(QS. Luqman: 27)

*“Science without religion is blind and religion without science is lame”*

Ilmu pengetahuan tanpa dilandasi agama akan buta dan agama tanpa didasari penguasaan ilmu pengetahuan akan menjadi lumpuh  
(Albert Einstein)

*“Barang siapa menghendaki dunia maka ia haruslah memiliki ilmunya; dan barang siapa menghendaki akhirat maka ia harus memiliki ilmunya juga; dan barang siapa menghendaki keduanya maka ia haruslah menguasai kedua ilmu itu pula.”* (Hadits Nabi)

## HALAMAN PERSEMBAHAN

يُؤْتِي الْحِكْمَةَ مَنْ يَشَاءُ وَمَنْ يُؤْتَ الْحِكْمَةَ فَقَدْ أُوتِيَ خَيْرًا كَثِيرًا  
وَمَا يَذَّكَّرُ إِلَّا أُولُو الْأَلْبَابِ ﴿٢٦٩﴾

*“Allah menganugerahkan al hikmah (kefahaman yang dalam tentang Al Quran dan As Sunnah) kepada siapa yang dikehendaki-Nya. Dan barangsiapa yang dianugerahi hikmah, ia benar-benar telah dianugerahi karunia yang banyak. Dan hanya orang-orang yang berakallah yang dapat mengambil pelajaran (dari firman Allah).”  
(QS. al Baqarah: 269)*

Puji syukur Alhamdulillahirabbil’aalamin

Sebuah langkah telah usai

Sebuah cita telah tercapai

Namun...

Itu bukan akhir dari perjalanan

Melainkan awal dari perjalanan berikutnya

Karena di setiap akhir, datang awal yang baru

Sebuah karya kecil ini penulis persembahkan  
untuk cahaya penuh kasih sayang & ketulusan, Biyung  
untuk kekuatan penuh cinta & tanggung jawab, Rama  
untuk inspirasi kerja keras & kegigihan, Kakak  
untuk pemberi kesempatan & naungan dalam mempelajari berbagai ilmu,  
Almamater kebanggaan (UIN MALIKI Malang)

*“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.  
Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan),  
kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain.”  
(QS. al Insyirah: 6-8)*

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anadiyatul Ulfa  
NIM : 09630048  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul penelitian : Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif  
Ekstrak Kulit Dahan Sirsak (*Annona muricata* Linn)  
Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 16 Januari 2014  
Yang membuat pernyataan,

Anadiyatul Ulfa  
NIM. 09630048

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum Wr. Wb.*

Syukur *Alhamdulillah* penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kulit Dahan Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach.**”

Sholawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi akhir zaman, yakni baginda Nabi Muhammad SAW yang telah menunjukkan jalan yang benar bagi umatnya.

Selanjutnya penulis haturkan ucapan terima kasih seiring doa dan harapan *jazakumullah ahsanal jaza'* kepada semua pihak yang telah memberikan kontribusi baik dukungan moril maupun materiil demi terselesaikannya skripsi ini. Dengan penuh kesungguhan dan kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Elok Kamilah Hayati, M. Si, selaku pembimbing utama.
2. Bapak Ahmad Hanapi, M. Sc, selaku konsultan.
3. Bapak Dr. H. Munirul Abidin, M. Ag, selaku pembimbing agama.
4. Ibu Diana Candra Dewi, M.Si, selaku penguji utama.
5. Ibu Hafidatul Hasanah, M. Si, selaku ketua penguji.

Yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat serta motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan seluruh pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, penulis menghaturkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada:

1. Keluarga kecilku Biyung Paining dan Rama Achmad Syahir, S. Pd yang senantiasa mendoakan dan memberikan kasih sayang tulus. Kakak Emmy Heniva, S. S beserta Kakak Ipar Davit Anwar Kamsay, S. HI yang senantiasa memberikan bantuan, motivasi dan inspirasi.
2. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M. Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M. Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M. Si, selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan pengarahan dan nasehat kepada penulis.
5. Seluruh Dosen Pengajar di Jurusan Kimia yang telah membagikan ilmu kepada penulis, khususnya Bapak A. Ghanaim Fasya, M. Si selaku dosen wali yang senantiasa memberikan pengarahan dan motivasi selama belajar di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Seluruh Staf Laboratorium (Mas Abi, Mas Taufik, Mbak Rika, Mbak Mei, dan Mbak Susi) dan Staf Administrasi (Mbak Ana dan Mbak Is) Jurusan Kimia atas bantuan dan pelayanannya selama belajar di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

7. Seluruh teman-teman Kimia angkatan 2009, khususnya satu tim penelitian (Lya, Icus, Devi, dan Indria) atas kerja samanya selama penelitian dan yang telah berbagi kebersamaan dalam senang maupun susah.
8. Seluruh teman-teman di Wisma Catalonia, khususnya Dinkha Nusrotul Amaliya dan Dzahimmatin Aliyah yang senantiasa memberikan bantuan dan motivasi.
9. Al Ghozali, Dwi Madina As Subhi, dan Aniq yang senantiasa mengingatkan dan memberikan nasehat kepada penulis selama proses penulisan skripsi.
10. Seluruh teman dan seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu atas segala bantuan yang telah diberikan kepada penulis.

Semoga Allah SWT memberikan balasan kebaikan dunia dan akhirat, atas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis, amin.

Dalam penulisan skripsi ini, penulis menyadari sepenuhnya bahwasanya masih banyak kekurangan-kekurangan dan masih jauh dari kesempurnaan, maka penulis mengharapkan adanya kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak. Akhir kata, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat khususnya bagi penulis dan pada umumnya bagi pembaca, amin.

Malang, 16 Januari 2014  
Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	x
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiv
<b>ABSTRAK</b> .....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	8
1.3 Tujuan Penelitian.....	9
1.4 Batasan Masalah.....	9
1.5 Manfaat Penelitian.....	10
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Fenomena Tumbuhan dalam Perspektif Al Quran.....	11
2.2 Sirsak ( <i>Annona muricata</i> Linn) dalam Perspektif Ilmu Pengetahuan .....	16
2.3 Kandungan Senyawa Aktif dalam Tumbuhan Famili <i>Annonaceae</i> .....	17
2.4 Ekstraksi Senyawa Aktif .....	20
2.5 Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach.....	25
2.5.1 Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT) .....	26
2.5.2 Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach.....	29
2.6 Identifikasi Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	33
2.7 Identifikasi Kandungan Senyawa Aktif pada Sirsak ( <i>Annona muricata</i> Linn) .....	37
2.7.1 Alkaloid .....	37
2.7.2 Flavonoid .....	41
2.7.3 Tanin.....	44
2.7.4 Saponin .....	46
2.7.5 Triterpenoid .....	49
2.7.6 Steroid.....	51

**BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	55
3.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	55
3.2.1 Alat .....	55
3.2.2 Bahan .....	56
3.3 Rancangan Penelitian .....	56
3.4 Tahapan Penelitian .....	57
3.5 Pelaksanaan Penelitian .....	58
3.5.1 Analisis Kadar Air .....	58
3.5.2 Preparasi Sampel .....	59
3.5.3 Ekstraksi Komponen Aktif .....	59
3.5.4 Uji Toksisitas dengan Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach... 61	
3.5.4.1 Penetasan Telur .....	61
3.5.4.2 Uji Toksisitas .....	61
3.5.5 Uji Fitokimia Komponen Aktif dengan Uji Reagen .....	63
3.5.5.1 Uji Alkaloid .....	63
3.5.5.2 Uji Flavonoid .....	63
3.5.5.3 Uji Tanin .....	63
3.5.5.3.1 Uji dengan $FeCl_3$ .....	63
3.5.5.3.2 Uji dengan Larutan Gelatin .....	64
3.5.5.4 Uji Saponin .....	64
3.5.5.5 Uji Triterpenoid dan Steroid .....	64
3.5.6 Identifikasi Komponen Aktif dengan KLT .....	64
3.6 Analisis Data .....	66

**BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Analisis Kadar Air .....	67
4.2 Preparasi Sampel .....	69
4.3 Ekstraksi Komponen Aktif .....	71
4.4 Uji Toksisitas dengan Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach .....	76
4.4.1 Penetasan Telur .....	77
4.4.2 Uji Toksisitas .....	79
4.5 Uji Fitokimia Komponen Aktif dengan Uji Reagen .....	89
4.6 Identifikasi Komponen Aktif dengan KLT .....	93
4.7 Pemanfaatan Tumbuhan dalam Perspektif Islam .....	100

**BAB V PENUTUP**

5.1 Kesimpulan .....	105
5.2 Saran .....	106

**DAFTAR PUSTAKA .....** 107**LAMPIRAN.....** 117

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Beberapa pelarut organik dan sifat fisiknya.....	23
Tabel 2.2 Kategori toksisitas bahan .....	28
Tabel 4.1 Kadar air yang terkandung dalam sampel kulit dahan sirsak segar.....	68
Tabel 4.2 Kadar air yang terkandung dalam sampel serbuk kulit dahan sirsak kering.....	69
Tabel 4.3 Hasil ekstraksi sampel serbuk kulit dahan sirsak kering.....	75
Tabel 4.4 Nilai LC <sub>50</sub> masing-masing ekstrak kulit dahan sirsak.....	85
Tabel 4.5 Hasil pengamatan uji fitokimia.....	89
Tabel 4.6 Data penampakan noda hasil KLT ekstrak kloroform kulit dahan sirsak berdasarkan 5 macam fase gerak setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard dan diamati di bawah sinar UV 366 nm.....	96
Tabel 4.7 Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid dengan eluen benzena : etil asetat (8:2) setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard.....	98

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tumbuhan sirsak ( <i>Annona muricata</i> Linn) .....	17
Gambar 2.2 Larva udang <i>Artemia salina</i> Leach .....	30
Gambar 2.3 Struktur inti senyawa alkaloid.....	38
Gambar 2.4 Struktur inti senyawa flavonoid .....	41
Gambar 2.5 Struktur inti senyawa tanin.....	44
Gambar 2.6 Struktur inti senyawa saponin .....	47
Gambar 2.7 Struktur golongan senyawa triterpenoid .....	49
Gambar 2.8 Struktur inti senyawa steroid.....	52
Gambar 4.1 Kurva mortalitas larva udang <i>Artemia salina</i> Leach ekstrak n-heksana dengan nilai $LC_{50} = 8,04317$ ppm .....	83
Gambar 4.2 Kurva mortalitas larva udang <i>Artemia salina</i> Leach ekstrak kloroform dengan nilai $LC_{50} = 3,38121$ ppm .....	83
Gambar 4.3 Kurva mortalitas larva udang <i>Artemia salina</i> Leach ekstrak etanol dengan nilai $LC_{50} = 1205,71$ ppm.....	84
Gambar 4.4 Dugaan reaksi terbentuknya warna pada uji terpenoid dengan reagen Lieberman-Burchard .....	92
Gambar 4.5 Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid dengan eluen benzena : etil asetat (8:2) setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard dan diamati di bawah sinar UV pada $\lambda$ 366 nm .....	97

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Diagram Alir Penelitian.....	117
Lampiran 2 Skema Kerja .....	118
Lampiran 3 Perhitungan dan Pembuatan Reagen dan Larutan .....	124
Lampiran 4 Data Analisis Kadar Air Sampel Segar dan Sampel Serbuk Kering Kulit Dahan Sirsak .....	130
Lampiran 5 Perhitungan Rendemen.....	133
Lampiran 6 Data Kematian Larva dan Perhitungan LC <sub>50</sub> Uji Toksisitas Masing-masing Ekstrak.....	135
Lampiran 7 Perhitungan Nilai Rf Hasil KLT Ekstrak Kloroform .....	144
Lampiran 8 Dokumentasi .....	146



## ABSTRACT

Ulfa, A. 2014. **Toxicity Test and Active Compounds Group Identification of Soursop (*Annona muricata* Linn) Stem Bark Extract Against *Artemia salina* Leach Shrimp Larvae**. Theses. Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, The State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: Elok kamilah Hayati, M. Si; Supervisor II: Dr. H. Munirul Abidin, M. Ag.

Toxicity and phytochemical test of soursop (*Annona muricata* Linn) stem bark extract were done against *Artemia salina* Leach. Allah SWT says in the Surah an Nahl verse 11 that the plant created manifold is a sign power of God that should be studied to be fully utilized for the welfare of human beings. The purposes of this research were to determine the toxicity level of each soursop (*Annona muricata* Linn) stem bark extract against *Artemia salina* Leach and to identify the compounds group contained in soursop (*Annona muricata* Linn) stem bark extract which has potential bioactivity to *Artemia salina* Leach.

This study includes soursop stem bark extraction through maceration method using 3 solvents which have different levels of polarity, such as n-hexane, chloroform, and ethanol. Then, concentrated extracts were toxicity tested by using shrimp larvae. Shrimp larvae mortality data were analyzed by probit analysis using MINITAB 16 to determine LC<sub>50</sub> values for each extract. The extracts which have potential optimal bioactivity tested through phytochemical compounds content by reagents test. Next, the extract identified by TLC phytochemical compounds group content based on positive reagent test results.

The results showed n-hexane and chloroform soursop stem bark extract have bioactivity against shrimp larvae, indicated with LC<sub>50</sub> values of each extract respectively is 3.38121 ppm and 8.04317 ppm. Whereas, the ethanol extract do not have bioactivity against shrimp larvae, indicated with LC<sub>50</sub> value of the extract is 1205.71 ppm. Then, triterpenoid compounds can be identified based on phytochemical test by reagents and TLC aid on compounds group in n-hexane and chloroform soursop stem bark extract.

Keywords: Soursop (*Annona muricata* Linn) stem bark, toxicity test, *Artemia salina* Leach, phytochemical test,

## ABSTRAK

Ulfa, A. 2014. **Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kulit Dahan Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach**. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Elok Kamilah Hayati, M. Si; Pembimbing II: Dr. H. Munirul Abidin, M. Ag.

**Kata kunci** : Kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn), uji toksisitas, *Artemia salina* Leach, uji fitokimia,

Telah dilakukan penelitian tentang uji toksisitas ekstrak kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan uji fitokimia. Firman Allah SWT dalam surat an Nahl ayat 11 bahwa tumbuhan diciptakan berjenis-jenis merupakan tanda kekuasaan Allah SWT yang harus dikaji dan dipelajari untuk dapat dimanfaatkan sepenuhnya bagi kesejahteraan manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas masing-masing ekstrak kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn) yang memiliki potensi bioaktivitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

Penelitian ini meliputi ekstraksi kulit dahan sirsak menggunakan metode maserasi dengan 3 pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda yaitu n-heksana, kloroform, dan etanol. Ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya diuji toksisitasnya dengan menggunakan larva udang. Data kematian larva udang dianalisis dengan analisis probit menggunakan MINITAB 16 untuk mengetahui nilai  $LC_{50}$  pada masing-masing ekstrak. Ekstrak yang memiliki potensi bioaktivitas optimal diuji kandungan senyawanya melalui uji fitokimia dengan uji reagen dan identifikasi selanjutnya dilakukan dengan KLT berdasarkan kandungan golongan senyawa yang positif dari hasil uji reagen.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak n-heksana dan kloroform kulit dahan sirsak memiliki bioaktivitas terhadap larva udang, ditunjukkan dengan nilai  $LC_{50}$  masing-masing ekstrak yaitu 8,04317 ppm dan 3,38121 ppm. Sedangkan untuk ekstrak etanol tidak memiliki bioaktivitas terhadap larva udang, ditunjukkan dengan nilai  $LC_{50}$  yaitu 1205,71 ppm. Dan golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak n-heksana dan kloroform kulit dahan sirsak berdasarkan uji fitokimia dengan uji reagen dan didukung dengan hasil KLT yaitu terdapat golongan senyawa triterpenoid.

## ملخص البحث

اولفي، أ . ٢٠١٤ . اختبار سمية وتعيين مجموعة المركبات النشطة استخراج الجلد الفرع السرساك (ننونا موريكاتا لين) ضد يرقات الروبيان الأرتيميا سالينا ليتش. البحث العلمي. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرفة الأولى: إلوك كميلا حياقي الماجستير، المشرف الثاني: د. منير العابدين الماجستير.

الكلمات الرئيسية: الجلد الفرع السرساك (ننونا موريكاتا لين)، اختبار السمية، الأرتيميا سالينا ليتش، اختبار النباتية،

وقد قام البحث على اختبار سمية الاستخراج الجلد الفرع السرساك (ننونا موريكاتا لين) ضد يرقات الروبيان الأرتيميا سالينا ليتش والاختبار الكيميائي النباتي. قال الله تعالى في سورة النحل الآية ١١، أن النباتات متنوعة وهذا من دليل خلق الله سبحانه وتعالى، ينبغي دراستها لتكون نافعة من أجل رفاهية الناس. ويهدف البحث لمعرفة مستوى السمية من كل استخراج الجلد الفرع السرساك (ننونا موريكاتا لين) ضد يرقات الروبيان الأرتيميا سالينا ليتش. ولمعرفة مجموعة المركبات في استخراج الجلد الفرع السرساك (ننونا موريكاتا لين) التي لديها النشاط الحيوي المحتمل لليرقات الروبيان الأرتيميا سالينا ليتش.

يشمل هذا البحث من استخراج الجلد الفرع السرساك باستخدام طريقة النقع و ٣ المذيبات التي لديها مستويات مختلفة من الأقطاب، وهي ن الهكسان، الكلوروفورم، والإيثانول. تم اختبار الاستخراج المركزة باستخدام سمية اليرقات الروبيان. وقد تم تحليل بيانات الوفيات اليرقات الروبيان بتحليل الاحتمالية باستخدام منتب ١٦ لتحديد قيم ل ج ٥٠ لكل استخراج. استخراج التي يملك القوة النشاط الحيوي المناسب جدا، اختبار المحتوى الكيميائي النباتي باختبار الكواشف ثم يتم إجراء الاختبار بكمياتوغرافيا الطبقة الرقيقة المحتوى الكيميائي النباتي من هذا الصنف على أساس نتائج الاختبار الكاشف.

أظهرت النتائج استخراج ن الهكسان و كلوروفورم الجلد الفرع السرساك يكون النشاط الحيوي ضد يرقات الروبيان، وأشار مع القيم ل ج ٥٠ كل استخراج أي ٥٤٣١٧ ، ٨ جزء في المليون و ٣٨١٢١ ، ٣ جزء في المليون. أما بالنسبة لاستخراج الايثانول لا يكون النشاط الحيوي ضد يرقات الروبيان، وأشار قيمة ل ج ٥٠ هو ٧١ ، ١٢٠٥ جزء في المليون. و مجموعة المركبات الواردة في استخراج ن الهكسان و كلوروفورم الجلد الفرع السرساك أساس الاختبار الكيميائي النباتي مع الكواشف ومعتمد كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من نتائج هذا الصنف من المركبات تريترينويد.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan Negara kepulauan yang terletak pada zona khatulistiwa dan memiliki iklim tropis. Iklim tropis inilah yang menyebabkan banyak jenis tumbuhan mampu tumbuh di Indonesia. Sehingga negara Indonesia dikenal dunia memiliki hutan hujan tropika yang kaya akan keanekaragaman flora. Diperkirakan flora Indonesia memiliki 30.000-40.000 spesies tumbuhan berbunga. Ini suatu jumlah yang melebihi aneka flora dari negara-negara tropika lainnya di dunia. Dari jumlah tersebut, terdapat tidak kurang dari 1.100 spesies tumbuhan yang dapat digunakan sebagai tumbuhan obat tradisional (Heyne, 1987). Menurut Kassahara dan Hemmi (1986), dari 28.000 jenis tumbuhan yang ditemukan di Indonesia,  $\pm$  7.000 jenis (7.577 jenis) diantaranya adalah tumbuhan obat.

Al Quran juga menyebutkan banyak ayat yang memberikan gambaran tentang keanekaragaman tumbuh-tumbuhan. Penyebutan segala macam tumbuh-tumbuhan, berjenis tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam merupakan isyarat fenomena taksonomis. Fenomena ini merupakan tanda-tanda kekuasaan Allah SWT bagi orang-orang yang berfikir, merenungkan dan mengkajinya (Rossidy, 2008). Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat Thaahaa ayat 53:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً  
فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

*Artinya: “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan Yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” (QS. Thahaa: 53).*

Sebenarnya adanya keanekaragaman flora tersebut merupakan tantangan tersendiri bagi manusia sekaligus tuntutan untuk mempelajarinya. Dengan mempelajari ilmu-ilmu mengenai tumbuhan tersebut manusia dapat mengungkap rahasia dan keajaiban di balik penciptaan melalui aktivitas dan penemuan ilmiah guna memperoleh atau mengambil manfaat bagi peningkatan kualitas hidup dan kesejahteraan di dunia (Rossidy, 2008). Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat an Nahl ayat 11:

يُنَبِّئُكُمْ بِهِ الزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِن كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي  
ذَٰلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ﴿١١﴾

*Artinya: “Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan” (QS. an Nahl: 11).*

Berdasarkan ayat tersebut dengan jelas menerangkan bahwa tumbuhan diciptakan berjenis-jenis dan bermacam-macam. Tidak dapat dipungkiri bahwa keanekaragaman tumbuhan adalah fenomena alam yang harus dikaji dan dipelajari, untuk dimanfaatkan sepenuhnya bagi kesejahteraan manusia. Keanekaragaman tumbuhan juga fenomena alam yang merupakan bagian dari tanda-tanda kekuasaan Allah SWT. Dan jelas bahwa tanda-tanda itu hanya dapat diketahui oleh orang-orang yang berakal (Rossidy, 2008).

Penggunaan obat herbal telah banyak dilakukan oleh masyarakat sebagai salah satu upaya pemanfaatan tumbuhan untuk menanggulangi masalah kesehatan. Tumbuhan obat mengandung bahan aktif penting terutama dari senyawa metabolit sekunder dengan struktur-struktur yang unik dan bervariasi, yang dikembangkan lebih jauh dengan meninjau hubungan gugus aktif senyawa dengan reseptor penyakit dalam tubuh (Copriady, *et. al.*, 2001).

Salah satu jenis tumbuhan yang banyak tumbuh di daerah tropis seperti Indonesia adalah *Annonaceae*. *Annonaceae* merupakan salah satu famili tumbuhan terbesar yang tersebar di daerah tropis dan subtropis dengan Asia dan Australia sebagai pusat utama penyebarannya. Famili ini memiliki 130 genus dan 2000 spesies. Indonesia memiliki lebih dari 20 genus dengan lebih dari 40 spesies *Annonaceae* (Heyne, 1987). Dari segi ekonomi, famili ini termasuk tumbuhan yang penting sebagai sumber buah-buahan yang dapat dimakan. Selain itu famili ini menunjukkan aktivitas insektisida, antitumor dan antifungal berdasarkan penelitian beberapa spesies dari Genus *Annona*, *Polyalthia*, *Uvaria* dan *Xylopia* (Hakim, *et. al.*, 2001).

Beberapa penelitian yang telah dilakukan terhadap beberapa tumbuhan yang memiliki taksonomi yang sama (*Annonaceae*) menyebutkan bahwa terdapat kandungan zat sitotoksik dalam tumbuhan tersebut. Zat sitotoksik tersebut diantaranya adalah *acetogenines*, *styryl lactons*, *isoflavan*, dan *alkaloid phenanthrenelactams* (Shiddiqi, *et. al.*, 2008). Dan salah satu spesies dari genus *Annona* yang dapat dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat adalah *Annona muricata*

Linn. Tumbuhan tersebut telah diteliti aktivitas senyawa yang terkandung pada setiap bagian dari tumbuhan.

Beberapa penelitian yang telah dilakukan mengenai tumbuhan *Annona muricata* Linn diantaranya adalah penelitian Rachmawati, *et. al.* (2012) dan Suyatmi, *et. al.* (2012) yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*) efektif menghambat pertumbuhan sel HeLa (karsinoma serviks manusia). Penelitian Hendana (2012) menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak ratu (*Annona muricata*) dan sirsak hutan (*Annona glabra*) mempunyai aktivitas terhadap larva udang *Artemia salina* dan dari penelitian Nazmi (2013) menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak hutan (*Annona glabra*) mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, dan tanin, yang mempunyai aktivitas terhadap larva udang *Artemia salina*.

Secara teoritis kandungan zat sitotoksik pada tumbuhan khususnya pada tumbuhan tingkat tinggi tidak hanya terbatas pada satu bagian tumbuhan, akan tetapi dapat dijumpai di seluruh bagian tumbuhan seperti batang, bunga, buah, atau akarnya (Ulfa, 2007). Selama ini telah banyak dilakukan penelitian dan terbukti terdapat senyawa bioaktif pada bagian tertentu dari tumbuhan *Annona muricata* Linn, seperti pada daun dan biji. Oleh karena itu, tidak menutup kemungkinan untuk dilakukannya penelitian pada bagian kulit dahan dari *Annona muricata* Linn, agar dapat mengungkap senyawa-senyawa yang bersifat bioaktif.

Beberapa penelitian yang telah dilakukan mengenai kulit batang tumbuhan yang satu famili dengan *Annona muricata* Linn diantaranya adalah penelitian Mahmiah (2006) yang menggunakan kulit batang tumbuhan *Saccopetalum*

*horsfieldii* Benn. Tumbuhan tersebut merupakan salah satu genus dari famili *Annonaceae*. Menunjukkan bahwa ekstrak kulit batang tumbuhan *S. horsfieldii* diperoleh senyawa golongan flavonoid. Penelitian Rahmawati *et. al.* (2013) menggunakan kulit batang tumbuhan *Xylopiya malayana* Hook. f. et Thomson menunjukkan terdapat golongan senyawa flavonoid, saponin, terpenoid, dan alkaloid. Dimana golongan senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan.

Penelitian Rahayu, *et. al.* (1993), yang telah melakukan pemeriksaan kandungan kimia dan pengujian antibakteri terhadap kulit batang srikaya (*Annona squamosa* Linn) melaporkan bahwa hasil pengujian fitokimia ekstrak kulit batang *Annona squamosa* L. mengandung senyawa kimia dari golongan fenol, alkaloid, steroid dan triterpenoid, flavonoid, tanin dan saponin. Dan dari hasil pengujian antibakteri ekstrak kulit batang sampai 10.000 ppm pelarut n-heksana dan kloroform efektif menghambat pertumbuhan *E. coli*. Berdasarkan hasil penelitian mengenai adanya kandungan senyawa-senyawa kimia yang bersifat bioaktif pada kulit batang tumbuhan yang satu famili dengan *Annona muricata* L. tersebut, maka diduga pada kulit dahan *Annona muricata* L. juga terdapat kandungan senyawa-senyawa kimia yang bersifat bioaktif.

Golongan senyawa kimia yang bersifat bioaktif yang terdapat pada tumbuhan dapat diperoleh melalui proses pemisahan. Dan proses pemisahan tersebut sangat dipengaruhi oleh metode pemisahan yang meliputi cara ekstraksi dan pelarut yang digunakan. Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan beberapa pelarut yang memiliki perbedaan kepolaran antara lain penggunaan pelarut n-heksana, kloroform, dan etanol

sebagai pelarut pada daging buah pare (*Momordica charantia* L.) menunjukkan tingkat toksisitas yang berbeda terhadap *Artemia salina* Leach. Dan dari hasil uji aktivitas terhadap *bacterium tumefaciens* A-208 menunjukkan tingkat aktivitas antitumor yang berbeda (Rita, *et. al.*, 2008). Begitu juga aktivitas yang diukur dari ekstrak anting-anting (*Acalypha indica* Linn), dimana aktivitas dari pelarut n-heksana, kloroform, dan etanol memberikan tingkat toksisitas yang berbeda pula (Halimah, 2010).

Metode ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut yang memiliki perbedaan kepolaran dapat mengekstrak golongan senyawa aktif pada masing-masing pelarut sesuai dengan kepolarannya. Adanya variasi pelarut dapat digunakan untuk mengetahui tingkat toksisitas pada masing-masing ekstrak yang sesuai dengan kelarutannya sehingga dapat digunakan sebagai acuan untuk mengetahui potensi bioaktivitas suatu senyawa (Sriwahyuni, 2010). Berdasarkan penelitian yang telah menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, dan etanol yang menunjukkan ekstrak masing-masing pelarut tersebut memiliki tingkat toksisitas yang berbeda, maka digunakan pelarut-pelarut tersebut untuk mengekstrak senyawa yang terdapat pada kulit dahan sirsak.

Berdasarkan asumsi mengenai banyaknya kandungan senyawa-senyawa kimia yang terdapat pada kulit dahan tumbuhan *Annona muricata* Linn (sirsak), maka perlu untuk dilakukan identifikasi awal bioaktifitas senyawa yang dilakukan dengan uji toksisitas. Uji toksisitas merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui aktivitas farmakologi suatu senyawa. Prinsipnya, komponen bioaktif bersifat toksik jika diberikan dengan dosis tinggi dan menjadi obat pada dosis rendah. Uji

toksisitas antara lain dilakukan dengan menggunakan metode uji kematian larva udang BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dengan larva *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji (Zebua, 2011).

Metode uji letalitas larva udang (BSLT) telah banyak digunakan sebagai metode pendahuluan (skrining awal) untuk mengetahui toksisitas suatu bahan. Hasil uji toksisitas dengan metode ini telah terbukti memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa antikanker. Selain itu, metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat, dan cukup akurat (Colegate dan Molyneux, 2007). Metode ini merupakan skrining awal yang dapat disempurnakan oleh *bioassay* lainnya yang lebih spesifik dan lebih mahal setelah senyawa aktif dari suatu bahan uji dapat dipisahkan (Pisutthanan, *et. al.*, 2004). Untuk itu, sebagai langkah awal untuk mengetahui potensi bioaktivitas dari kulit dahan tumbuhan sirsak dilakukan uji BSLT.

Penelitian yang telah dilakukan berkaitan dengan uji toksisitas dengan metode BSLT pada tumbuhan *Annona muricata* Linn (sirsak) antara lain hasil penelitian uji toksisitas ekstrak etanol dan fraksi n-heksana daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap larva *Artemia salina* Leach yang telah dilakukan oleh Iskandar, *et. al.* (2012) menunjukkan bahwa fraksi n-heksana dan ekstrak etanol memiliki tingkat toksisitas yang tinggi dengan nilai  $LC_{50}$  masing-masing 5,394 ppm dan 21,511 ppm. Dan dari hasil pengujian fitokimia mengandung golongan senyawa alkaloid, kuinon, tanin, flavanoid, dan steroid. Hasil penelitian Sinurat (2011) juga menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana dan etanol daun sirsak

memiliki tingkat toksisitas yang tinggi dengan nilai  $LC_{50}$  masing-masing 3,66 ppm dan 0,73 ppm.

Penelitian ini menggunakan sampel kering dari kulit dahan tumbuhan sirsak (*Annona muricata* L.). Pemisahan senyawa aktif dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, dan etanol yang memiliki perbedaan kepolaran. Kemudian dilakukan pengujian potensi toksisitas ekstrak dengan uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* L. (metode BSLT). Untuk mengetahui kandungan golongan senyawa dilakukan pengujian fitokimia dengan uji reagen terhadap ekstrak kulit dahan sirsak (*Annona muricata* L.) yang memiliki potensi bioaktivitas terhadap larva udang *Artemia salina* L. dan untuk menegaskan hasil uji reagen dilakukan identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) terhadap ekstrak yang positif mengandung golongan senyawa tertentu. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengetahui tingkat toksisitas dan golongan senyawa aktif pada kulit dahan tumbuhan sirsak (*Annona muricata* L.) untuk dapat dilakukan pengujian bioaktivitas lebih lanjut.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana nilai  $LC_{50}$  masing-masing ekstrak n-heksana, kloroform, dan etanol kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn) berdasarkan hasil uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach?

2. Golongan senyawa apakah yang terdapat dalam ekstrak kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn) yang memiliki potensi bioaktivitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui nilai  $LC_{50}$  masing-masing ekstrak n-heksana, kloroform, dan etanol kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn) berdasarkan hasil uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.
2. Untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn) yang memiliki potensi bioaktivitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

### 1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn) dari Desa Kalilanang, Kecamatan Ringinrejo, Kabupaten Kediri.
2. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi dengan menggunakan tiga pelarut yang memiliki tingkat kepolaran berbeda yaitu n-heksana p.a. (non polar), kloroform p.a. (semi polar), dan etanol p.a. (polar).
3. Uji toksisitas yang dilakukan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* dengan hewan uji larva udang *Artemia salina* Leach.
4. Tingkat toksisitas yang ditunjukkan melalui nilai  $LC_{50}$  yang diukur dengan analisa probit.

5. Identifikasi golongan senyawa aktif dengan uji fitokimia dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).
6. Identifikasi golongan senyawa aktif meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan triterpenoid/ steroid.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat mengenai efek toksik ekstrak kulit dahan sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap larva udang (*Artemia salina* L.) serta golongan senyawa yang terkandung di dalamnya, sehingga dapat dimanfaatkan di bidang farmakologi. Berdasarkan efek toksik yang ditimbulkan dapat digunakan sebagai acuan untuk dilakukan pengujian bioaktivitas lebih lanjut, yaitu untuk mendapatkan dosis/ konsentrasi yang aman penggunaannya terhadap manusia.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Fenomena Tumbuhan dalam Perspektif Al Quran

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki tingkat keanekaragaman tumbuhan yang tinggi. Beberapa faktor penyebab terjadinya keanekaragaman tumbuhan di Indonesia yang melimpah, yakni Indonesia merupakan wilayah yang memiliki kondisi tanah yang subur, yang mengandung unsur-unsur kimia yang diperlukan bagi tumbuhan. Selain itu, Indonesia memiliki iklim tropis karena dilewati garis khatulistiwa. Iklim tersebut memiliki pengaruh yang sangat besar terutama suhu udara dan curah hujan. Dimana daerah yang curah hujannya tinggi memiliki hutan yang lebat dan jenis tumbuhannya lebih bervariasi. Sungguh besar nikmat Allah SWT yang telah dilimpahkan kepada manusia tersebut, sehingga sebagai manusia yang telah diciptakan Allah SWT patut untuk mensyukuri atas nikmat tersebut.

Al Quran telah memberikan gambaran mengenai keadaan tanah yang baik dan yang buruk yang dapat ditumbuhi bermacam-macam tumbuhan sebagaimana dalam surat al A'raaf ayat 58 sebagai berikut:

وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ تَخْرُجُ نَبَاتُهُ بِإِذْنِ رَبِّهِ ۗ وَالَّذِي خَبثَ لَا يَخْرُجُ إِلَّا نَكْدًا ۗ  
كَذَلِكَ نُصَرِّفُ الْآيَاتِ لِقَوْمٍ يَشْكُرُونَ ﴿٥٨﴾

*Artinya: “Dan tanah yang baik, tanaman-tanamannya tumbuh subur dengan seizin Allah; dan tanah yang tidak subur, tanaman-tanamannya hanya tumbuh merana. Demikianlah Kami mengulangi tanda-tanda kebesaran (Kami) bagi orang-orang yang bersyukur.” (QS. al A'raaf: 58).*

Ayat tersebut menjelaskan bahwa sesungguhnya bumi itu, diantaranya ada yang tanahnya baik (subur) dan pemurah, yang tanam-tanamannya keluar dengan mudah dan tumbuh dengan cepat. Dengan demikian banyak hasilnya dan enak buah-buahannya. Ada pula diantaranya yang tanahnya buruk (tidak subur), seperti tanah hitam berbatu, dan tanah tandus yang tanam-tanamannya tidak tumbuh (Al Maraghi, 1993). Dan Indonesia merupakan negara dengan kondisi tanah yang subur, sehingga banyak tumbuh bermacam-macam tumbuhan yang cukup potensial untuk dimanfaatkan. Hal tersebut merupakan tanda-tanda kebesaran Allah SWT bagi makhluk-Nya dan sebagai manusia (makhluk Allah SWT) maka harus bersyukur atas nikmat tersebut.

Bermacam-macam tumbuhan dihidupkan atau ditumbuhkan oleh Allah SWT dengan air. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat al An'aam ayat 99:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ ۗ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

*Artinya: "Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman." (QS. al An'aam: 99).*

Ayat tersebut mengandung makna bahwa Allah SWT yang menurunkan air hujan dari awan. Kemudian dengan air hujan itu Allah SWT mengeluarkan setiap jenis tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam bentuk, ciri khas, serta berbeda-beda tingkatan kelebihan dan kekurangannya. Semua itu menunjukkan kekuasaan Yang Membuat dan kebijaksanaan Yang Mencipta (Al Maraghi, 1993).

Al Quran tidak hanya memberi isyarat tentang keanekaragaman tumbuhan sebatas informasi bahwa tumbuhan itu bermacam-macam. Tetapi juga memberi isyarat agar memperhatikan atau mempelajari bagaimana tumbuhan itu diciptakan untuk dipergunakan oleh manusia dengan sebaik-baiknya. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat asy Syu'ara ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

*Artinya: "Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik" (QS. asy Syu'ara: 7).*

Berdasarkan ayat tersebut terdapat makna bahwa sebagai manusia hendaknya berfikir tentang berbagai keajaiban kekuasaan Allah SWT, dan juga memperhatikan bumi dengan berbagai jenis, bentuk, dan warna tumbuh-tumbuhannya yang membuktikan kekuasaan serta kekuatan Allah Yang Maha Tinggi dan Maha Besar (Al Maraghi, 1993). Salah satu kegiatan yang menunjukkan perhatian manusia terhadap bermacam-macam tumbuhan yang telah diciptakan Allah SWT adalah memanfaatkannya sebagai tumbuhan obat untuk menanggulangi masalah kesehatan.

Sebagaimana sabda Nabi Muhammad SAW yang memerintahkan agar berobat pada saat ditimpa penyakit. Karena Setiap penyakit itu pasti ada obatnya.

Sebagaimana sabda Nabi Muhammad SAW berikut (Shihab, 2007):

تَدَاوَوْا فَإِنَّ اللَّهَ لَمْ يَنْزِلْ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ مَعَهُ دَوَاءً غَيْرَ دَاءٍ وَاحِدٍ وَهُوَ الْهَرَمُ (رواه أبو

داود و الترمذي عن أسامة بن شريك)

Artinya : “Berobatlah, karena tiada satu penyakit yang diturunkan Allah, kecuali diturunkan pula obat penangkalnya, selain dari satu penyakit, yaitu ketuaan.” (HR. Abu Daud dan At Tirmidzi dari sahabat Nabi, Usamah bin Syuraik)

Hadits di atas memberikan pengertian kepada kita bahwa semua penyakit yang menimpa manusia, Allah SWT turunkan beserta obatnya. Kadang ada orang yang menemukan obatnya, ada juga orang yang belum bisa menemukannya. Dan pada zaman Nabi Muhammad SAW dahulu berkembang metode pengobatan dengan menggunakan obat-obatan alami (obat herbal), yakni dengan memanfaatkan tumbuh-tumbuhan.

Allah SWT telah menyediakan bagi manusia segala yang telah Dia ciptakan di langit dan di bumi, yang berkaitan dengan kemaslahatan-kemaslahatan, dan yang karenanya penghidupan manusia menjadi tegak (Al Maraghi, 1993). Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat al Jaatsiyah ayat 13:

وَسَخَّرَ لَكُم مَّا فِي السَّمَوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا مِّنْهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ

يَتَفَكَّرُونَ ﴿١٣﴾

Artinya: “Dan Dia telah menundukkan untukmu apa yang di langit dan apa yang di bumi semuanya, (sebagai rahmat) daripada-Nya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang berfikir.” (QS. al Jaatsiyah: 13)

Ayat tersebut terbukti bahwa al Quran merupakan sumber ilmu pengetahuan yang luar biasa. Allah SWT telah mengisyaratkan al Quran diturunkan sebagai rahmat bagi orang-orang yang berfikir. Manusia yang menguasai ilmu pengetahuan karena iman kepada Allah SWT, pada hakekatnya telah mendapatkan jalan pendekatan diri kepada Tuhan Yang Maha Kuasa lagi Maha Perkasa. Berkat ilmu pengetahuan manusia dapat mengelola kekayaan alam yang ada di bumi ini dengan sebaik-baiknya untuk kesejahteraan dirinya. Mengingat bahwa ilmu pengetahuan begitu pula kekayaan alam yang ada di bumi ini adalah pemberian Tuhan, maka sudah sewajarnya apabila manusia yang merasa telah menguasai ilmu pengetahuan makin mendekatkan dirinya kepada Sang Pemberi yaitu Allah SWT serta sekaligus mengakui akan kekuasaan-Nya (Wardhana, 2004).

Dari segi kimia, kekayaan alam hayati merupakan sumber senyawa kimia yang tak terbatas jenis maupun jumlahnya. Dengan demikian keanekaragaman hayati dapat diartikan sebagai keanekaragaman kimiawi yang mampu menghasilkan bahan-bahan kimia, baik untuk kebutuhan manusia maupun organisme lain seperti untuk obat-obatan, insektisida, kosmetika, dan sebagai bahan dasar sintesa senyawa organik yang lebih bermanfaat (Achmad, 1986).

Salah satu pemanfaatan sumber senyawa kimia alami yaitu melakukan pengobatan dengan menggunakan ramuan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan baik berupa akar, kulit batang, kayu, daun, bunga, atau bijinya. Agar pengobatan tersebut dapat dipertanggungjawabkan maka diperlukan penelitian ilmiah seperti

penelitian di bidang farmakologi, toksikologi, identifikasi, dan isolasi zat kimia aktif yang terdapat dalam tumbuhan.

## **2.2 Sirsak (*Annona muricata* Linn) dalam Perspektif Ilmu Pengetahuan**

Sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan tumbuhan yang berasal dari daerah tropis Amerika Selatan. Tumbuhan sirsak berupa pohon yang ukurannya tidak begitu besar dengan tinggi pohon antara 3-8 meter. Daunnya berwarna hijau tua, tampak mengkilat dan kaku. Ukuran buahnya agak besar, berat rata-rata 0,2-2 kg. Produksi rata-rata tiap pohon sekitar 25 buah per musim. Buahnya yang sudah tua memiliki tanda-tanda, seperti jarak duri renggang, tangkai buah menguning, aroma lebih harum dan menusuk (Widyastutik dan Paimin, 1992).

Tumbuhan sirsak dapat tumbuh di sembarang tempat. Buah yang besar dan banyak dapat diperoleh dengan cara ditanam di daerah yang tanahnya cukup mengandung air. Sirsak di Indonesia tumbuh dengan baik pada daerah yang mempunyai ketinggian kurang dari lima meter di atas permukaan laut. Pengembangbiakan sirsak yang paling baik adalah melalui okulasi dan akan menghasilkan buah pada usia 4 tahun setelah ditanam (Oberlies, 2003).

Tumbuhan sirsak dalam sistematika tumbuhan (taksonomi)

diklasifikasikan sebagai berikut (Anonim, 2013):

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)  
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)  
 Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)  
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)  
 Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)  
 Sub Kelas : Magnoliidae  
 Ordo : Magnoliales  
 Famili : Annonaceae  
 Genus : Annona  
 Spesies : *Annona muricata* L.



Gambar 2.1 Tumbuhan Sirsak (*Annona muricata* L.) (Anonim, 2013)

### 2.3 Kandungan Senyawa Aktif dalam Tumbuhan Famili *Annonaceae*

Beberapa penelitian yang telah dilakukan terhadap beberapa tumbuhan yang memiliki taksonomi yang sama (*Annonaceae*) menyebutkan bahwa terdapat kandungan zat sitotoksik dalam tumbuhan tersebut. Zat sitotoksik tersebut diantaranya adalah *acetogenines*, *styril lactons*, *isoflavan*, dan *alkaloid phenanthrenelactams* (Shiddiqi, *et. al.*, 2008).

Sirsak (*Annona muricata* L.) termasuk dalam famili *Annonaceae*. Paimin (2001) melaporkan bahwa sirsak mengandung senyawa *caffeine hydrocyanic acid*, *myricyl alcohol*, dan *sterol* sedangkan batang dan pohonnya mengandung senyawa tanin, fitosterol, Ca-oksalat, dan alkaloid murisine.

Santi (2011) melakukan uji fitokimia terhadap biji sirsak menunjukkan bahwa pada biji sirsak terdapat senyawa golongan triterpenoid aldehyd yang mempunyai aktivitas antimakan (menghambat selera makan serangga) terhadap *Epilachna sparsa*. Mulyawati (2010) telah mengisolasi jenis senyawa ekstrak etil asetat biji sirsak menunjukkan terdapat beberapa jenis senyawa diantaranya adalah asam linoleat, asam oktadekanoat, asam palmitat dan 2-furankarboksaldehid. Senyawa tersebut mempunyai aktivitas terhadap mortalitas hama thrips pada tumbuhan jarak pagar.

Nazmi (2013) melakukan uji fitokimia terhadap daun sirsak gundul (*Annona glabra*) menunjukkan terdapat golongan senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, dan tanin. Iskandar, *et. al.* (2012) melakukan pengujian fitokimia terhadap ekstrak etanol daun sirsak menunjukkan bahwa daun sirsak mengandung golongan senyawa alkaloid, kuinon, tanin, flavonoid, dan steroid. Golongan senyawa tersebut mempunyai potensi bioaktivitas terhadap larva udang *Artemia salina*.

Senyawa metabolit sekunder dalam tumbuhan biasanya tersebar merata ke seluruh bagian tumbuhan tetapi dalam kadar yang berbeda-beda (Robinson, 1995; Markham, 1998). Berdasarkan beberapa penelitian yang telah disebutkan di atas mengenai hasil pengujian fitokimia golongan senyawa yang terdapat pada setiap

bagian dari tumbuhan sirsak seperti pada daun dan biji, maka dapat diduga pada bagian kulit dahan sirsak juga mengandung golongan senyawa yang sama seperti pada daun dan biji, akan tetapi kadarnya yang berbeda.

Mahmiah (2006) telah mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa flavonoid dari kulit batang tumbuhan *Saccopetalum horsfieldii* Benn. Rahmawati, *et. al.* (2013) menggunakan kulit batang tumbuhan *Xylopiya malayana* Hook. f. et Thomson menunjukkan terdapat golongan senyawa flavonoid, saponin, terpenoid, dan alkaloid. Rahayu, *et. al.* (1993) melaporkan dari hasil uji fitokimia kandungan kimia yang terdapat pada masing-masing bagian tumbuhan srikaya (akar, daun, dan kulit batang) pada umumnya adalah senyawa fenol dan senyawa alkaloid. Ketiga tumbuhan tersebut merupakan dalam famili *Annonaceae*.

Berdasarkan teori kekerabatan sesama tumbuhan, Venkataraman (1976) mengemukakan bahwa spesies tumbuhan yang termasuk dalam genus yang sama dari suatu famili tumbuhan tertentu akan mengandung senyawa-senyawa kimia yang sama atau senyawa kimia dengan kerangka struktur yang sama, hanya saja intensitasnya bisa berbeda tergantung dari ekosistem dan tantangan alam yang dihadapi oleh spesies tersebut. Dari hasil pengujian fitokimia ekstrak kulit batang tumbuhan famili sirsak mengandung beberapa golongan senyawa, yang kemungkinan juga terdapat pada kulit dahan sirsak. Karena merupakan satu famili.

## 2.4 Ekstraksi Senyawa Aktif

Ekstraksi adalah suatu metode pemisahan komponen-komponen dari suatu campuran dimana komponen yang larut masuk ke dalam pelarut yang dipakai sedangkan komponen yang tidak larut akan tertinggal di dalam bahan. Metode yang paling sederhana yang digunakan untuk mengekstraksi padatan adalah mencampurkan seluruh bahan dengan pelarut, kemudian memisahkannya dari padatan yang tidak larut (Lehninger dan Baverloo, 1976). Dalam metode ekstraksi bahan alam, dikenal suatu metode maserasi yaitu metode perendaman. Penekanan utama dalam metode ini adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dengan jaringan yang diekstraksi (Guenther, 1987). Ekstraksi beberapa senyawa metabolit sekunder dari kulit dahan tumbuhan sirsak (*Annona muricata* L.) pada penelitian ini menggunakan ekstraksi maserasi untuk mengantisipasi senyawa yang rentan terhadap panas.

Pemilihan metode ekstraksi bergantung pada berbagai faktor. Faktor-faktor yang harus diperhatikan dalam memilih metode ekstraksi menurut Houghton dan Raman (1998) adalah:

1. Tujuan dari ekstraksi
2. Skala (polaritas, efek berbagai pH, kestabilan terhadap panas)
3. Karakteristik pelarut yang digunakan (toksisitas, reaktivitas, biaya)
4. Kegunaan ekstrak
5. Penggunaan kembali pelarut

Metode maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling mudah dan cepat. Prinsip dari metode ini adalah penghancuran dan perendaman bahan dalam

pelarut. Metode ini tidak membutuhkan suhu tinggi sehingga cocok untuk mengekstrak bahan yang tidak tahan panas (komponen volatil). Keuntungan metode ini adalah metodenya yang sederhana dan dapat menghindari terjadinya kerusakan komponen tertentu yang tidak tahan panas. Metode ini biasa digunakan untuk mengekstrak jaringan tumbuhan yang belum diketahui senyawanya yang kemungkinan bersifat tidak tahan panas, sehingga kerusakan komponen tersebut dapat dihindari. Kelemahan metode ini adalah kebutuhan bahan pelarutan yang cukup banyak dibandingkan dengan metode lain (Meloan, 1999).

Tahapan yang harus diperhatikan dalam mengekstraksi jaringan tumbuhan adalah penyiapan bahan sebelum ekstraksi yang meliputi penghalusan atau pengrajanan simplisia, pemilihan pelarut dan kondisi ekstrak, proses pengambilan pelarut, pengawasan mutu dan pengujian serta usulan proses ekstraksi yang akan digunakan (Sabel dan Warren, 1973).

Pada saat proses ekstraksi zat aktif tumbuhan harus memperhatikan tingkat kehalusan yang cocok dari material awal, dengan meningkatnya tingkat kehalusan, maka luas permukaan yang terkena cairan ekstraksi akan semakin besar. Serbuk dengan penghalusan yang tinggi kemungkinan sel-sel yang rusak juga semakin besar, sehingga memudahkan pengambilan bahan kandungan langsung oleh bahan pelarut (Octavia, 2009).

Pemilihan pelarut yang akan digunakan juga harus sesuai dengan tujuan yang ingin dicapai, karena pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan dalam proses ekstraksi. Terdapat dua pertimbangan utama dalam memilih jenis pelarut, yaitu pelarut harus mempunyai daya larut yang tinggi dan pelarut tidak

berbahaya atau tidak beracun. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dapat melarutkan ekstrak yang diinginkan saja, mempunyai kelarutan yang besar, tidak menyebabkan perubahan secara kimia pada komponen ekstrak, dan titik didih kedua bahan tidak boleh terlalu dekat (Bernasconi, 1995). Menurut Heath dan Reinessius (1987), yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut adalah daya melarutkan komponen yang diinginkan, titik didih, sifat racun, mudah tidaknya terbakar dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi.

Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Secara umum pelarut-pelarut golongan alkohol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder (Lenny, 2006).

Prosedur klasik untuk memperoleh kandungan senyawa organik dari jaringan tumbuhan kering adalah dengan proses ekstraksi berkesinambungan dengan menggunakan sederetan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya (Harborne, 1987). Polaritas sering diartikan sebagai adanya pemisahan kutub muatan positif dan negatif dari suatu molekul sebagai akibat terbentuknya konfigurasi tertentu dari atom-atom penyusunnya. Dengan demikian, molekul tersebut dapat tertarik oleh molekul yang lain yang juga mempunyai polaritas yang kurang lebih sama. Besarnya polaritas dari suatu zat pelarut proporsional dengan besarnya konstanta dielektriknya (Adnan, 1997).

Suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda-beda dalam pelarut yang berbeda. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang

relatif sama kepolarannya. Semakin besar konstanta dielektrik, maka akan semakin besar kepolaran pelarut tersebut. Prinsip pelarutan yang dipakai pada metode ini adalah *like dissolve like* artinya pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut nonpolar akan melarutkan senyawa nonpolar (Khopkar, 2003). Tingkat polaritas suatu pelarut dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Beberapa pelarut organik dan sifat fisiknya

Pelarut	Titik didih (°C)	Titik beku (°C)	Konstanta dielektrik
Dietil eter	35	-116	4,3
Aseton	56	-95	20,7
Kloroform	61	-64	4,8
N-heksana	68	-94	1,8
Etil asetat	77	-84	6,0
Etanol	78	-117	24,3
Metanol	65	-98	32,6
Air	100	0	80,2

Sumber: Nur dan Adijuwana (1989)

Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah n-heksana p.a., kloroform p.a., dan etanol p.a. yang didasarkan pada pemilihan variasi pelarut yang sesuai. Pelarut-pelarut tersebut memiliki titik didih yang cukup rendah agar pelarut dapat mudah diuapkan tanpa menggunakan suhu yang tinggi, bersifat inert, dapat melarutkan senyawaan yang sesuai dengan cukup cepat serta memiliki harga yang terjangkau (Guenther, 1987). Peran pelarut yang digunakan tersebut adalah untuk mendapatkan senyawa aktif yang terkandung dalam kulit dahan tumbuhan sirsak. Untuk melepaskan komponen nonpolar dari suatu jaringan tumbuhan tersebut dibutuhkan pelarut nonpolar seperti n-heksana. Pelarut etanol

dibutuhkan untuk melepaskan komponen yang lebih polar karena sifatnya lebih polar daripada n-heksana. Selanjutnya kloroform dapat digunakan untuk melepaskan komponen semi polar pada kulit dahan tumbuhan sirsak.

Metode ekstraksi maserasi dilakukan dengan cara merendam sampel dalam pelarut organik. Pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif akan larut. Karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel (Cheong, 2005).

Iskandar, *et. al.* (2012) mengekstraksi daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol tiga kali berturut-turut, masing-masing selama 24 jam. Rahayu, *et. al.* (1993) membuat ekstrak bunga, biji, daun, akar, dan kulit batang srikaya dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol, kloroform, dan n-heksana masing-masing selama 24 jam. Bahan disaring dan dipekatkan dengan alat evaporator pada suhu 45 °C hingga pelarut menguap seluruhnya.

Wardhana, *et. al.* (2004) membuat ekstrak biji sirsak dengan cara 150 g serbuk daging biji srikaya dan 250 mL n-heksana dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer berukuran 500 mL kemudian diaduk menggunakan *shaker* selama 24 jam. Campuran serbuk daging biji srikaya dan n-heksana disaring sehingga diperoleh supernatan. Ampasnya dicampur 250 ml n-heksana dan diaduk selama 1 jam. Larutan tersebut disaring lagi dan ditampung ke dalam labu erlenmeyer bercampur dengan hasil saringan pertama. Supernatan yang diduga mengandung

bahan aktif biji srikaya dipindahkan ke dalam labu evaporator, selanjutnya diuapkan dengan suhu 40 °C. Proses ekstraksi dihentikan setelah semua senyawa n-heksana menguap.

## 2.5 Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

Uji toksisitas merupakan bagian dari toksikologi, adapun toksikologi sendiri didefinisikan sebagai ilmu tentang aksi berbahaya zat kimia atau mekanisme biologi tertentu. Setiap zat kimia pada kondisi tertentu mampu menimbulkan suatu tipe efek atas jaringan biologi, oleh karena itu uji toksikologi merupakan uji yang menentukan kondisi-kondisi yang dapat menimbulkan efek. Toksisitas merupakan sifat relatif yang digunakan dalam membandingkan suatu senyawa dengan senyawa yang lain dengan menunjukkan ke suatu efek berbahaya atas jaringan biologi tertentu. Bahan yang dapat menyebabkan kerusakan atau kematian pada sistem biologi disebut sebagai racun. Bahan-bahan tersebut dapat berasal dari sumber alam atau sintesis (Loomis, 1978).

Suatu senyawa kimia dikatakan bersifat racun akut jika senyawa tersebut dapat menimbulkan efek racun dalam jangka waktu singkat. Suatu senyawa kimia disebut bersifat racun kronis jika senyawa tersebut dapat menimbulkan efek racun dalam jangka waktu panjang (karena kontak yang berulang-ulang walaupun dalam jumlah yang sedikit). Batas toksisitas dapat diukur dalam ukuran LD<sub>50</sub> (LD = *Lethal Dose*) atau LC<sub>50</sub> (LC = *Lethal Concentration*) (Mansyur, 2002; Ambara, 2007). LC<sub>50</sub> adalah kadar atau konsentrasi suatu zat, yang dinyatakan dalam miligram bahan kimia per meter kubik media uji (*part per million/ ppm*), yang

dapat menyebabkan 50% kematian pada binatang percobaan dari suatu kelompok spesies setelah binatang percobaan tersebut terpapar dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004).

### 2.5.1 Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Meyer, *et. al.* (1982) memperkenalkan suatu metode uji untuk menentukan suatu senyawa bahan alam dengan cepat dan murah sebagai penapisan ekstrak tanaman aktif dengan menggunakan hewan uji *A. salina* Leach. Uji toksisitas ini dapat diketahui dari jumlah kematian larva *A. salina* karena pengaruh ekstrak atau senyawa bahan alam dengan konsentrasi yang telah ditentukan (McLaughlin, *et. al.*, 1998). Uji ini dikenal sebagai *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Uji toksisitas ini dapat digunakan untuk skrining awal terhadap senyawa aktif yang diduga berkhasiat sebagai antitumor (Sunarni, *et. al.*, 2003). Uji ini seringkali mempunyai korelasi positif dengan potensinya sebagai antikanker (Anderson dan McLaughlin, 1991).

Uji toksisitas larva udang *Artemia salina* telah digunakan sejak 1956 untuk berbagai pengamatan bioaktivitas senyawa bahan alam. Uji toksisitas larva udang memang tidak spesifik untuk antitumor, tetapi kemampuannya untuk mendeteksi 14 dari 24 *Euphorbiaceae* yang aktif terhadap uji leukimia *in vivo* mencit dan mendeteksi 2 dari 6 ekstrak *Euphorbiaceae* yang aktif terhadap uji karsinoma nasofaring. Hal ini memungkinkan uji toksisitas larva udang dapat digunakan sebagai uji penapisan senyawa bioaktif tahap awal dari rangkaian uji toksisitas untuk mendapatkan dosis yang aman bagi manusia. Beberapa kelebihan dari uji bioaktivitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva

udang adalah cepat waktu ujinya, sederhana (tanpa teknik aseptik), murah (tidak perlu serum hewan), jumlah organisme banyak, memenuhi kebutuhan validasi statistik dengan sedikit sampel (Meyer, *et. al.*, 1982).

BSLT merupakan pengujian senyawa secara umum yang dapat mendeteksi beberapa bioaktivitas dalam suatu ekstrak. Bioaktivitas yang dapat dideteksi dari skrining awal dengan metode BSLT diantaranya adalah antikanker, antitumor, antimalaria, antimikroba, *immunosuppressive*, *antifeedant* dan residu pestisida (Colegate dan Molyneux, 2007).

Menurut Meyer *et. al.* (1982), prinsip metode BSLT adalah menggunakan tingkat kematian naupli (*Artemia* yang baru menetas) pada berbagai tahap perkembangan hidupnya untuk mengetahui toksisitas suatu bahan. Stadia (fase hidup) larva yang paling umum digunakan adalah larva 24-48 jam setelah menetas. Pada stadia lebih tua dari naupli atau stadia *artemia* dewasa juga biasa digunakan sebagai organisme penyeleksi. Konsentrasi letal untuk kematian 50% populasi naupli setelah 6 jam perlakuan (akut LC<sub>50</sub>) atau konsentrasi letal untuk kematian 50% populasi naupli setelah 24 jam perlakuan (kronik LC<sub>50</sub>) dapat diartikan sebagai ukuran toksisitas kandungan racun dalam suatu bahan. Waktu pilihan ditentukan oleh daya serap dari suatu ekstrak. Tingkat toksisitas suatu bahan dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Kategori toksisitas bahan

Kategori	LC <sub>50</sub> (ppm)
Sangat toksik	< 30
Toksik	30-1000
Tidak toksik	>1000

Sumber : Meyer, *et. al.* (1982)

Sifat sitotoksik dapat diketahui berdasarkan jumlah kematian larva pada konsentrasi tertentu. Suatu ekstrak dikatakan toksik jika memiliki nilai LC<sub>50</sub> (konsentrasi yang mampu membunuh 50% larva udang) kurang dari 1000 ppm setelah waktu kontak 24 jam (Meyer *et. al.* 1982). Pengujian dilakukan pada ekstrak sampel dengan berbagai konsentrasi dan dibuat kontrol (perlakuan sama hanya saja tanpa diberi ekstrak sampel). Bila dalam larutan kontrol terdapat larva udang yang mati, maka jumlah larva udang sampel adalah jumlah larva udang pada tiap-tiap konsentrasi dikurangi jumlah larva udang laut yang mati pada larutan kontrol (Mc.Laughlin, 1991).

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{Tes-Kontrol}}{\text{Kontrol}} \times 100 \% \dots\dots\dots (\text{II.1})$$

Nilai LC<sub>50</sub> merupakan angka yang menunjukkan konsentrasi suatu bahan yang menyebabkan kematian sebesar 50% dari jumlah hewan uji. Metode BSLT diterapkan dengan menentukan nilai LC<sub>50</sub> setelah perlakuan 24 jam. Melalui metode BSLT maka pelaksanaan skrining akan berlangsung relatif cepat dengan biaya yang relatif murah karena hanya ekstrak atau senyawa yang memang memiliki aktivitas biologis yang nantinya akan diyakinkan efeknya dengan pengujian bioaktivitas lebih lanjut yang memerlukan penanganan lebih rumit, lama dan biaya relatif mahal (Dwiatmaka, 2001). Jadi uji toksisitas dengan

menggunakan metode BSLT ini merupakan uji awal untuk mengetahui apakah senyawa memiliki potensi bioaktivitas terhadap larva udang *Artemia salina* L., yang selanjutnya dapat dilakukan pengujian bioaktivitas lebih lanjut.

### 2.5.2 Larva Udang *Artemia salina* Leach

Menurut Mudjiman (1989), udang renik asin (*brine shrimp*) atau *artemia* adalah udang-udangan tingkat rendah yang hidup sebagai *zooplankton* yang menghuni perairan-perairan yang berkadar garam tinggi (*salina*), baik dekat pantai maupun jauh di pedalaman laut.

Klasifikasi *Artemia* pada dunia hewan adalah sebagai berikut (Mudjiman, 1989):

Divisi	: Animal
Phylum	: Arthropoda
Kelas	: Crustaceae
Subkelas	: Branchiopoda
Ordo	: Anostraca
Familia	: Arthemidae
Genus	: Artemia
Species	: <i>Artemia salina</i> Leach



Gambar 2.2 Larva Udang *Artemia salina* Leach (Arief, 2011)

Keunggulan penggunaan *A. salina* untuk uji BSLT adalah bersifat peka terhadap bahan uji, siklus hidup yang lebih cepat, mudah dibiakkan, dan harganya murah. Sifat peka *A. salina* kemungkinan disebabkan oleh keadaan membran kulitnya yang tipis sehingga memungkinkan terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya (Meyer, *et. al.* 1982). Zat atau senyawa asing yang ada di lingkungannya akan terserap ke dalam tubuhnya secara difusi dan langsung mempengaruhi kehidupannya. Larva udang yang sensitif ini akan mati apabila zat atau senyawa asing tersebut bersifat toksik (Hamburger dan Hostettmann, 1991).

Istilah untuk telur *A. salina* adalah *siste*, yaitu telur yang telah berkembang lebih lanjut menjadi embrio dan kemudian diselubungi oleh cangkang yang tebal dan kuat. Cangkang ini berguna untuk melindungi embrio terhadap pengaruh kekeringan, benturan keras, sinar ultraviolet, dan mempermudah pengapungan. Oleh karena itu, ia sangat tahan menghadapi keadaan lingkungan yang buruk (Mudjiman, 1989).

Apabila siste *A. salina* direndam dalam air laut bersuhu 25 °C, maka akan menetas dalam waktu 24-36 jam. Dari dalam cangkangnya keluarlah larva yang juga dikenal dengan istilah *nauplius*. Dalam perkembangan selanjutnya, larva akan mengalami 15 kali perubahan bentuk atau metamorphosis. Setiap kali larva mengalami perubahan bentuk merupakan satu tingkatan. Larva tingkat I dinamakan instar I, tingkat II dinamakan instar II, tingkat III dinamakan instar III, demikian seterusnya sampai instar XV. Setelah itu berubahlah menjadi *Artemia* dewasa (Mudjiman, 1989).

Larva yang baru saja menetas masih dalam tingkatan instar I. Warnanya kemerah-merahan karena masih banyak mengandung makanan cadangan. Oleh karena itu mereka masih belum perlu makan. Anggota badannya terdiri dari sepasang sungut kecil (*antenul* atau antenna I) dan sepasang sungut besar (*antenul* atau antenna II). Di bagian sungut besar terdapat sepasang *mandibulata* (rahang) yang kecil, sedangkan di bagian *ventral* (perut) terdapat *labrum* (Mudjiman, 1989).

Sekitar 24 jam setelah menetas, larva akan berubah menjadi instar II. Pada tingkatan instar II, larva sudah mempunyai mulut, saluran pencernaan, dan dubur. Oleh karena itu, mereka mulai mencari makanan. Bersamaan dengan itu, cadangan makanannya juga sudah mulai habis. Pengumpulan makanannya mereka lakukan dengan menggerakkan antenna II-nya. Selain itu, untuk mengumpulkan makanan, antenna II tersebut juga berguna untuk bergerak (Mudjiman, 1989).

Pada tingkatan selanjutnya mulai terbentuk sepasang mata majemuk, selain itu berangsur-angsur tumbuh tunas-tunas kakinya. Setelah menjadi instar

XV, kakinya sudah lengkap sebanyak 11 pasang, maka berakhirilah masa larva, dan berubah menjadi *A. salina* dewasa (Mudjiman, 1989).

Uji BSLT dengan menggunakan *A. salina* dilakukan dengan menetasakan telur-telur *A. salina* dalam air laut yang dibantu dengan aerasi. Telur *A. salina* akan menetas sempurna dalam waktu 24 jam. *A. salina* yang baik digunakan untuk uji BSLT adalah yang berumur 48 jam sebab jika lebih dari itu dikhawatirkan kematian *A. salina* bukan karena toksisitas ekstrak, melainkan oleh terbatasnya persediaan makanan (Meyer, *et. al.*, 1982).

Makanan *Artemia salina* terdiri atas ganggang renik, bakteri dan cendawan. Dalam pemeliharaan makanan yang diberikan adalah katul padi, tepung terigu, tepung kedelai, dan ragi. *Artemia* hanya dapat menelan makanan yang berukuran kecil yaitu kurang dari 50 mikron. Apabila makanan lebih besar dari ukuran itu, makanan tidak akan tertelan karena *Artemia* mengambil makanan dengan jalan menelannya bulat-bulat. Makanan yang akan ditelan itu dikumpulkan dulu ke depan mulut dengan menggerak-gerakkan kakinya. Gerakan kaki dilakukan terus-menerus hingga makanan akan terus bergerak masuk ke dalam mulutnya. Selain untuk mengambil makanan, kakinya berfungsi sebagai alat untuk bergerak dan bernafas (Mudjiman, 1989).

Meyer, *et. al.* (1982) berpendapat bahwa ketersediaan telur, kemudahan dalam menetasakan telur menjadi larva, pertumbuhan yang cepat dari naupli dan relatif mudah dalam mempertahankan populasi dalam kondisi laboratorium membuat kondisi *A. salina* merupakan hewan percobaan yang efektif dan sederhana dalam ilmu biologi dan toksikologi.

Penelitian dengan larva *Artemia salina* Leach telah digunakan oleh Pusat Kanker Purdue, Universitas Purdue di Lafayette untuk senyawa aktif tumbuhan secara umum dan tidak spesifik untuk zat antikanker. Namun demikian hubungan yang signifikan dari sampel yang bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach ternyata juga mempunyai aktifitas sitotoksik. Berdasarkan hal tersebut maka larva *Artemia salina* Leach dapat digunakan untuk uji toksisitas (Meyer, *et. al.*, 1982).

## **2.6 Identifikasi Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromatografi adalah dasar teknik pemisahan multistage pada perbedaan antara komponen penyerap permukaan atau pelarut pada cairan (Meloan, 1999). Kromatografi merupakan metode pemisahan yang paling banyak digunakan untuk tujuan kualitatif, kuantitatif, dan preparatif. Pemisahan dengan kromatografi dilakukan dengan memodifikasi langsung beberapa sifat umum molekul seperti kelarutan, adsorptibilitas, dan volatilitas (Gritter, *et. al.*, 1991).

Teknik kromatografi untuk pemisahan suatu campuran komponen dipengaruhi oleh sifat kelarutan dari komponen yang bersangkutan di dalam eluennya, sifat interaksi komponen dengan bahan yang terdapat dalam fase diam dan interaksi pelarut dengan fase gerak (Harborne, 1987).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada hakikatnya melibatkan 2 sifat fase yaitu diam atau sifat lapisan dan gerak atau campuran pelarut pengembang. Fase diam dapat berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai permukaan penyerap atau berfungsi sebagai penyangga atau lapisan zat cair. Pada penelitian ini digunakan

fase diam dari silika gel yang mampu menjerap senyawa yang akan dipisahkan. Fase gerak dapat berupa hampir segala macam pelarut atau campuran pelarut sebagaimana dalam penelitian ini digunakan campuran pelarut yang efektif untuk memisahkan masing-masing komponen senyawanya yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda (Gritter, *et. al.*, 1991).

Pomeranz dan Meloan (1980) menyatakan beberapa keuntungan KLT antara lain waktu operasi yang cepat, peralatan sederhana, dan mudah disiapkan, tidak memerlukan keahlian khusus dan banyak parameter percobaan yang dapat divariasikan untuk mendapatkan efek pemisahan. Keuntungan lain dari KLT menurut Widjanarko (2008) adalah dapat memisahkan senyawa yang sangat berbeda seperti senyawa organik alam dan senyawa organik sintesis, kompleks organik dan anorganik serta ion anorganik dalam waktu singkat menggunakan alat yang tidak terlalu mahal. Metode ini kepekaannya cukup tinggi dengan jumlah cuplikan beberapa mikrogram.

Prinsip-prinsip KLT yang utama adalah adsorben, pengembangan, dan deteksi. Sedangkan menurut Ault (1976) teknik-teknik KLT yang penting meliputi persiapan plat, pengembangan, dan visualisasi. Christie (1982) menyatakan bahwa silika gel adalah adsorben yang paling umum digunakan untuk berbagai tujuan dan biasanya mengandung kalsium sulfat yang berfungsi sebagai pengikat untuk meningkatkan daya adhesi lapisan pada plat.

Lapisan tipis seperti pada plat silika gel F<sub>254</sub> yang digunakan dalam penelitian ini mengandung indikator flourosensi yang ditambahkan untuk membantu penampakan bercak berwarna pada lapisan yang telah dikembangkan.

Indikator fluoresensi adalah senyawa yang memancarkan sinar, seperti dengan lampu UV (Gritter, *et. al.*, 1991).

Pengembangan dilakukan dalam suatu bejana yang telah dijenuhkan dengan pelarut dan kejenuhan dipertahankan selama pengembangan. Larutan pengembang dapat berupa satu atau lebih campuran pelarut yang ditentukan lewat percobaan (Ault, 1976).

Tahap selanjutnya setelah pengembangan adalah deteksi atau visualisasi. Bercak yang terjadi setelah pengembangan dapat dideteksi. Deteksi paling sederhana adalah jika senyawa menunjukkan penyerapan di daerah UV gelombang pendek (radiasi utama pada kira-kira 254 nm) atau jika senyawa itu dapat dieksitasi ke fluoresensi radiasi UV 254 nm atau UV 366 nm dan deteksi dengan menggunakan pereaksi kimia untuk mendeteksi kandungan kimia dalam bercak. Cara yang digunakan untuk mendeteksi senyawa berfluoresensi adalah dengan dipendarkan pada sinar ultraviolet. Adapun untuk senyawa yang tidak berfluoresensi, fase diam ditambah indikator fluoresensi. Bercak akan kelihatan gelap dengan cara penyemprotan. Bercak kemudian dilihat dengan sinar tampak atau lampu ultraviolet. Setelah penyemprotan kadang-kadang diperlukan pemanasan (Stahl, 1985).

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah dari lapisan tipis menggunakan harga  $R_f$ . Harga  $R_f$  didefinisikan sebagai berikut (Sastrohamidjojo, 2007):

$$R_f = \frac{\text{Jarak senyawa yang digerakkan dari titik asal}}{\text{Jarak pelarut yang digerakkan dari titik asal}} \dots\dots\dots(\text{II.2})$$

Harga Rf merupakan parameter karakteristik Kromatografi Lapis Tipis. Harga ini merupakan ukuran kecepatan migrasi suatu senyawa kromatogram dalam kondisi konstan dan hasilnya sama jika diulang pada senyawa yang sama dan kondisi yang sama. Harga Rf suatu senyawa setiap elusi tergantung pada mutu dan sifat tetap, lapisan adsorpsi, jumlah senyawa yang ditotolkan, suhu ruangan serta derajat kejenuhan bejana. Angka Rf berjarak antara 0.00 sampai 1,00 dan hanya ditentukan dua desimal (Stahl, 1985).

Berdasarkan beberapa penelitian identifikasi golongan senyawa dengan menggunakan KLT yang telah dilakukan antara lain Sriwahyuni (2010) melakukan identifikasi dengan menggunakan KLT pada ekstrak etil asetat tanaman anting-anting (*Acalypha indica* Linn) untuk noda yang dihasilkan pada eluen butanol : asam asetat : air (14:1:5) menunjukkan warna ungu dan ungu kehitaman, dengan nilai Rf 0,61 dan 0,8. Sehingga kedua noda yang dihasilkan pada ekstrak etil asetat diasumsikan mengandung senyawa tanin. Untuk uji alkaloid menggunakan eluen kloroform: metanol (9,5:0,5) terdapat 5 noda dengan nilai Rf antara 0,27-0,87; yang berwarna ungu kecoklatan, merah muda keunguan, dan jingga kecoklatan. Untuk golongan senyawa steroid menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7:3) dan pereaksi Lieberman-Burchard menghasilkan 9 noda berwarna hijau kebiruan, hijau, biru kehijauan, dan oranye kecoklatan dengan nilai Rf antara 0,06-0,83.

Halimah (2010) melakukan identifikasi untuk senyawa flavonoid ekstrak etanol tanaman anting-anting (*Acalypha indica* Linn) dengan eluen n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) yang diuapi dengan uap amoniak menunjukkan 4 noda

yang berwarna biru kehijauan, ungu, dan merah keunguan dengan nilai Rf 0,26; 0,4; 0,56; dan 0,82. Marlina, *et. al.* (2005) menggunakan eluen n-heksana : aseton (4:1) dengan pereaksi  $SbCl_3$  dalam asam asetat untuk senyawa saponin ekstrak etanol labu siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) menghasilkan 2 noda berwarna kuning dengan nilai Rf 0,87 dan 0,79. Reveny (2011) menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (8:2) dengan pereaksi Lieberman-Burchard untuk senyawa triterpenoid pada ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper betle* Linn.) menghasilkan 2 noda berwarna ungu merah dengan nilai Rf 0,41 dan 0,29.

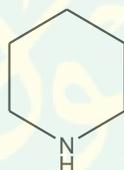
### **2.7 Identifikasi Kandungan Senyawa Aktif pada Sirsak (*Annona muricata* Linn)**

Tumbuhan umumnya mengandung senyawa bioaktif dalam bentuk metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid/ steroid dan lain-lain. Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktivitas dan berfungsi sebagai pelindung tumbuhan tersebut dari gangguan hama penyakit untuk tumbuhan itu sendiri atau lingkungannya (Lenny, 2006).

#### **2.7.1 Alkaloid**

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan dalam sebagian besar atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin heterosiklik (Lenny, 2006). Alkaloid dapat ditemukan dalam berbagai bagian

tumbuhan seperti biji, daun, ranting dan kulit kayu. Alkaloid memang jarang ditemukan dalam jaringan mati. Umumnya alkaloid terakumulasi dalam jaringan yang tumbuh aktif seperti epidermis, hipodermis dan kelenjar lateks. Adapun fungsi alkaloid dalam tumbuhan belum diketahui begitu pasti, walaupun beberapa senyawa ditafsirkan berperan sebagai pengatur, atau penolak dan pengikat serangga. Sampai saat ini, penggolongan senyawa alkaloid belum ada yang digunakan secara umum. Hal ini disebabkan karena alkaloid mempunyai struktur yang banyak jenisnya, sehingga penggolongan alkaloid berdasarkan strukturnya untuk membedakan jenis yang satu dengan yang lain sukar dilakukan (Suradikusumah, 1989).



Gambar 2.3 Struktur inti senyawa alkaloid (Robinson, 1995)

Penggolongan alkaloid dilakukan berdasarkan sistem cincinnya, misalnya piridina, piperidina, indol, isokuinolina, dan tropana. Senyawa ini biasanya terdapat dalam tumbuhan sebagai garam berbagai senyawa organik dan sering ditangani di laboratorium sebagai garam dengan asam hidroklorida dan asam sulfat (Robinson, 1995).

Fungsi alkaloid dalam tumbuhan masih sangat kabur, meskipun masing-masing senyawa telah dinyatakan terlibat sebagai pengatur tumbuh, atau penghalau atau penarik serangga. Teori yang menyatakan bahwa alkaloid

merupakan bentuk penyimpan nitrogen dalam tumbuhan, sekarang ini tidak lagi diterima (Harborne, 1987).

Pelarut atau pereaksi alkaloid biasanya menggunakan kloroform, aseton, amoniak dan metilena klorida. Pereaksi Mayer (kalium tetraiodomerkurat) paling banyak untuk mendeteksi alkaloid karena pereaksi ini mengendapkan hampir semua alkaloid. Pereaksi lain yang sering digunakan seperti pereaksi Wagner (iodium dalam kalium iodida), asam silikotungstat 5%, asam tanat 5%, pereaksi Dragendorff (kalium tetraiodobismutat), dan iodoplatinat. Kromatografi Lapis Tipis merupakan salah satu cara cepat untuk pemisahan alkaloid dengan silika gel sebagai penjerapnya. Pereaksi yang paling umum digunakan untuk menyemprot kromatogram adalah pereaksi Dragendorff (Robinson, 1995).

Berdasarkan beberapa penelitian mengenai analisis skrining fitokimia yang telah dilakukan antara lain Lusiana (2009) melakukan uji fitokimia dengan uji reagen untuk senyawa alkaloid dari ekstrak akar *Albortisia papuana* BECC diperoleh hasil uji positif alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna berturut-turut putih, coklat, dan merah jingga terhadap pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff.

Sriwahyuni (2010) juga melakukan uji fitokimia untuk senyawa alkaloid dengan menggunakan reagen Dragendorff dan Mayer menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat tanaman anting-anting (*Acalypha indica* Linn) positif mengandung senyawa alkaloid karena terbentuk endapan jingga ketika ditambahkan reagen dragendorff dan endapan putih ketika ditambahkan reagen Mayer. Dan untuk pemisahan senyawa alkaloid Hertiani dan Pratiwi (2002) melakukan identifikasi

dengan KLT untuk senyawa alkaloid ekstrak kulit batang makutadewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (2:1). Hasil senyawa alkaloid ditunjukkan dengan pembentukan warna oranye-merah dengan penyemprotan pereaksi Dragendorff.

Berdasarkan penelitian Sriwahyuni (2010) yang melakukan identifikasi menggunakan KLT golongan senyawa alkaloid menggunakan eluen kloroform : metanol (9,5:0,5) dengan pereaksi Dragendorff menghasilkan terdapat 5 noda dengan Rf antara 0,27-0,87. Noda ke 4 dan 5 menunjukkan warna jingga kecoklatan dan jingga kecoklatan tua sehingga pada ekstrak etil asetat tanaman anting-anting terdapat senyawa alkaloid.

Arifin, *et. al.* (2006) melakukan identifikasi dengan KLT untuk senyawa alkaloid ekstrak etanol daun *Eugenia cumini* Merr. dengan menggunakan eluen etil asetat : metanol : air (100:13,5:10) didapat noda pada Rf 0,83 yang berwarna jingga dengan penampakan noda Dragendorff, yang diperkirakan mengandung senyawa golongan alkaloid.

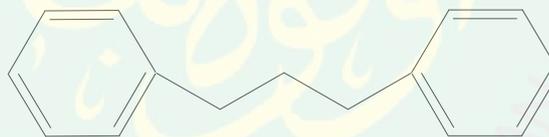
Krisyuninda (2012) menggunakan eluen kloroform : aseton (6:5) (v/v) dan berpendar bila diamati dengan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Menunjukkan adanya senyawa alkaloid pada ekstrak spons *Callispongia* sp. dengan adanya noda berwarna Oranye sampai merah bata dengan nilai Rf 0,81.

Asriyanti (2011) menggunakan eluen asam asetat : metanol (9:1) dengan pereaksi Dragendorff menghasilkan noda dengan nilai Rf 0,63 yang berwarna

coklat di bawah UV 254 nm. Noda tersebut menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid pada ekstrak n-heksana daun kemangi hutan (*Ocimum sp.*).

### 2.7.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang tersebar luas di alam. Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa  $C_6-C_3-C_6$  yang artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus  $C_6$  (cincin benzen tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Pengelompokan flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan pada rantai  $C_3$ , sesuai struktur kimianya yang termasuk flavonoid yaitu flavonol, flavon, flavanon, katekin, antosianidin dan kalkon (Robinson, 1995).



Gambar 2.4 Struktur inti senyawa flavonoid (Robinson, 1995)

Pada tumbuhan, flavonoid dapat meningkatkan dormansi, meningkatkan pembelahan sel-sel kalus, sebagai enzim penghambat pembentukan protein, menghasilkan zat warna pada bunga, untuk merangsang serangga, burung dan satwa lainnya untuk mendatangi tumbuhan tersebut sebagai agen dalam penyerbukan dan penyebaran biji. Dalam dunia pengobatan, beberapa senyawa flavonoid berfungsi sebagai antibodi, misalnya antivirus dan jamur, peradangan

pembuluh darah dan dapat digunakan sebagai racun ikan (Vickery dan Vickery, 1981).

Larutan pengembang flavonoid pada KLT yang paling populer adalah butanol : asam asetat : air (4:1:5). Pelarut yang bersifat basa cenderung menguraikan flavonoid, sedangkan pelarut asam dapat menyebabkan asilasi bagian gula sehingga menimbulkan bercak jadian (Robinson, 1995).

Beberapa penelitian yang telah dilakukan mengenai skrining fitokimia golongan senyawa flavonoid antara lain Marliana, *et. al.* (2005) melakukan analisis skrining fitokimia dengan uji reagen untuk senyawa flavonoid ekstrak etanol buah labu siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) menggunakan metode Bate Smith & Mertcalf dan metode Wilstater sianidin menghasilkan adanya senyawa flavonoid dengan terbentuknya warna oranye untuk metode Bate Smith & Mertcalf dan warna merah untuk metode Wilstater sianidin. Fitriyani, *et. al.* (2011) juga melakukan skrining fitokimia dengan metode Wilstater didapatkan perubahan warna merah jingga yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid pada ekstrak metanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav).

Indrayani, *et. al.* (2006) melakukan uji fitokimia dengan cara dilarutkan ekstrak dalam 1-2 ml metanol panas 50%. Setelah itu ditambahkan logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Dan pada ekstrak etil asetat dan metanol terbentuk larutan berwarna merah atau jingga yang menunjukkan adanya flavonoid pada ekstrak etil asetat dan metanol daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl).

Halimah (2010) melakukan identifikasi dengan KLT untuk senyawa flavonoid pada ekstrak etanol anting-anting (*Acalypha indica* Linn) dengan

menggunakan eluen n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) yang diuapi dengan uap amoniak menunjukkan terbentuknya 4 noda yang terpisah di bawah sinar UV 366 nm, dengan Rf berturut-turut 0,26; 0,4; 0,56; dan 0,82; masing-masing berwarna biru kehijauan, biru kehijauan, ungu, dan merah keunguan.

Ambarwati (2007) melakukan identifikasi dengan KLT untuk senyawa flavonoid pada ekstrak biji mimba (*Azadirachta indica*) dengan menggunakan eluen etil asetat : asam formiat : asam asetat : air (100:11:11:27) diperoleh nilai Rf sebesar 0,33. Fitriyani, *et. al.* (2011) menggunakan eluen kloroform : metanol : air (9,7:0,2:0,1) dan pereaksi uap amoniak menunjukkan timbul bercak berwarna kuning pucat pada Rf 0.5; setelah disemprot dengan penampak noda uap amoniak timbul noda warna kuning intensif pada Rf 0.5 yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid pada ekstrak metanol daun sirih merah.

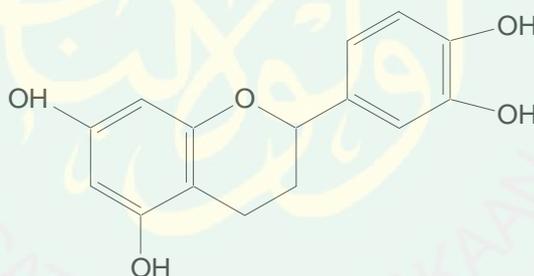
Inayah (2011) menggunakan eluen metanol : kloroform (1:39) dengan pereaksi uap amoniak menghasilkan pemisahan yang terbaik dengan nilai Rf antara 0,1-0,91 yang berwarna merah muda, merah, jingga, merah jingga, ungu, dan merah kaunguan di bawah sinar UV 366 nm. Noda tersebut positif mengandung golongan senyawa flavonoid pada ekstrak metanol anting-anting (*Acalypha indica* Linn).

Wonohadi, *et. al.* (2006) melakukan skrining kandungan kimia dengan KLT fraksi kloroform ekstrak etanol rimpang temu giring (*Curcuma heyneana* Val & Van Zijp) menggunakan eluen kloroform : etil asetat (60:40) dengan pereaksi uap amoniak menunjukkan adanya golongan flavonoid. Noda flavonoid tampak ada dua yaitu noda kuning (Rf 0,34) dan noda kuning muda (Rf 0,51).

### 2.7.3 Tanin

Tanin merupakan golongan senyawa fenol yang terdapat pada daun, buah yang belum matang, merupakan golongan senyawa aktif tumbuhan yang termasuk golongan flavonoid, mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Secara kimia tanin dibagi menjadi dua golongan, yaitu tanin terkondensasi atau tanin katekin dan tanin terhidrolisis atau tanin galat (Robinson, 1995).

Beberapa tanin terbukti memiliki aktifitas antioksidan, menghambat pertumbuhan tumor dan menghambat enzim seperti "reverse" transkriptase dan DNA topoisomerase (Robinson, 1995).



Gambar 2.5 Struktur inti senyawa tanin (Robinson, 1995)

Pelarut yang digunakan untuk mendeteksi campuran tanin terkondensasi adalah butanol : asam asetat : air (14:1:5), diikuti dengan asam asetat 6% merupakan pelarut yang cukup baik. Bercak diperiksa dengan sinar UV lalu dengan penyemprot  $\text{FeCl}_3$  menghasilkan warna lembayung (Harborne, 1987).

Sriwahyuni (2010) melakukan uji fitokimia senyawa tanin dengan menambahkan ekstrak dengan larutan  $\text{FeCl}_3$ . Berdasarkan uji fitokimia pada

ekstrak etil asetat anting-anting (*Acalypha indica* Linn), pada ekstrak etil asetat mengandung senyawa tanin yaitu terbentuknya warna hijau kehitaman dengan penambahan  $\text{FeCl}_3$ . Dan uji fitokimia senyawa tanin dengan menggunakan larutan gelatin menunjukkan ekstrak etil asetat terdapat sedikit endapan putih, pada ekstrak diklorometana dan petroleum eter tidak terdapat endapan.

Indrayani, *et. al.* (2006) melakukan uji fitokimia dengan cara dilarutkan ekstrak dalam 1-2 ml air dan ditambahkan 2 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$ , pada ekstrak kloroform, etil asetat dan metanol daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) timbul warna biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin galat dan warna hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin katekol.

Fitriyani, *et. al.* (2011) melakukan Skrining polifenol dan tanin menggunakan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  menunjukkan pada ekstrak metanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) terjadi perubahan warna dari kuning menjadi hijau kehitaman dengan penambahan  $\text{FeCl}_3$ . Hasil positif dari uji  $\text{FeCl}_3$  menunjukkan adanya kandungan senyawa tanin.

Sriwahyuni (2010) melakukan identifikasi menggunakan KLT golongan senyawa tanin pada ekstrak etil asetat tanaman anting-anting menggunakan eluen butanol : asam asetat : air (14:1:5) dan asam asetat glasial : air : HCl pekat (30:10:3). Hasil penelitian menunjukkan senyawa tanin dengan eluen butanol : asam asetat : air (14:1:5) dan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  menghasilkan 2 noda dengan Rf 0,61 yang tidak berwarna dan Rf 0,8 berwarna hijau kekuningan pada pengamatan dengan sinar tampak dan berwarna ungu dan ungu kehitaman pada UV 366 nm. Dan untuk senyawa tanin dengan eluen asam asetat glasial : air : HCl pekat

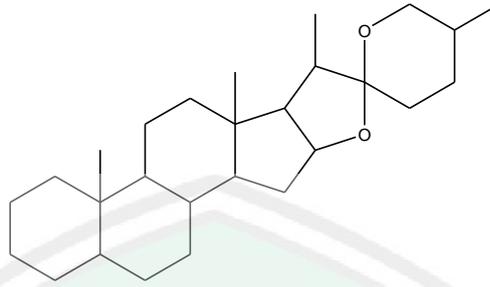
(30:10:3) dan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  menghasilkan 2 noda dengan Rf 0,4 dan 0,489 yang masing-masing berwarna biru muda dan hijau kebiruan pada pengamatan dengan sinar tampak dan berwarna ungu kahitaman dan ungu pada UV 366 nm.

Fitriyani, *et. al.* (2011) melakukan identifikasi senyawa tanin dengan KLT menggunakan eluen kloroform : metanol : air (7:3:0,4) dan terdapat noda pada Rf 0.2 yang berubah warna menjadi hitam setelah diberi penampak noda  $\text{FeCl}_3$ . Adanya warna hitam tersebut menunjukkan bahwa dalam ekstrak metanol daun sirih merah mengandung tanin.

Sa'adah (2010) menggunakan eluen etil asetat : kloroform : asam asetat 10 % (15:5:2) dengan pendeteksi  $\text{AlCl}_3$  1 % menghasilkan 2 noda yang terpisah dengan baik dengan Rf 0,30 dan 0,51. Noda tersebut berwarna coklat kehijuan dan ungu kemerahan pada ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.).

#### 2.7.4 Saponin

Saponin termasuk dalam golongan senyawa terpenoid dan bagian dari triterpenoid (diturunkan dari hidrokarbon  $\text{C}_{30}$ ). Saponin merupakan glikosida triterpenoid dan sterol. Senyawa ini merupakan senyawa aktif yang permukaannya bersifat seperti sabun dan dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa yang stabil dan dapat menghemolisis sel darah. Pembentukan busa yang stabil sewaktu mengekstrak tumbuhan atau pemekatan ekstrak tumbuhan merupakan bukti adanya saponin (Harborne, 1987).



Gambar 2.6 Struktur inti senyawa saponin (Robinson, 1995)

Untuk uji saponin yang sederhana adalah dengan menggunakan ekstrak alkohol, air dari tumbuhan dalam tabung reaksi dan perhatikan terbentuknya busa yang tahan lama pada permukaan cairan. Pemisahan saponin melalui plat silika gel KLT menggunakan larutan pengembang seperti butanol yang dijenuhkan dengan air atau kloroform : methanol : air (13:7:2) (Harborne, 1987).

Pada tumbuhan, saponin mempunyai fungsi yang sama dengan triterpenoid karena mengandung turunan dari senyawa ini, diantaranya dapat meningkatkan daya kecambah benih dan menghambat pertumbuhan akar, menghambat pertumbuhan sel-sel tumor pada tumbuhan dan satwa. Saponin digunakan sebagai bahan pencuci karena memiliki sifat emulsi, dapat digunakan untuk meningkatkan kolesterol serum, sebagai zat antibiotik, tahan jamur, anti influenza dan peradangan tenggorokan, sebagai bahan dasar untuk mendapatkan sapogenin yang berguna untuk menghasilkan hormon pertumbuhan pada satwa dan dapat digunakan sebagai racun ikan (Vickery dan Vickery, 1981).

Marliana, *et. al.* (2005) melakukan analisis skrining fitokimia dengan uji reagen untuk senyawa saponin pada ekstrak etanol buah labu siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) menggunakan metode Forth dan metode Lieberman-Burchard

menghasilkan adanya senyawa saponin dengan terbentuknya buih untuk metode Forth dan cincin warna hijau untuk metode Lieberman-Burchard. Fitriyani, *et. al.* (2011) juga melakukan uji buih menghasilkan buih stabil yang menunjukkan adanya saponin ekstrak metanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav).

Marliana, *et. al.* (2005) melakukan analisis dengan KLT senyawa saponin dengan menggunakan eluen n-heksana : aseton (4:1) dan pereaksi  $SbCl_3$  dalam asam asetat menghasilkan noda dengan Rf 0,84 dan 0,79 yang berwarna merah jambu pada pengamatan dengan sinar tampak dan berwarna kuning pada UV 366 nm menegaskan adanya kandungan saponin pada ekstrak etanol labu siam.

Setiaji (2009) melakukan analisis dengan KLT menggunakan eluen metanol : kloroform (4:1) untuk ekstrak etanol 70% rhizoma binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) dengan pereaksi anisaldehyde-asam sulfat menunjukkan noda berwarna kuning dengan nilai Rf 0,80. Noda pada ekstrak tersebut menandakan adanya senyawa saponin.

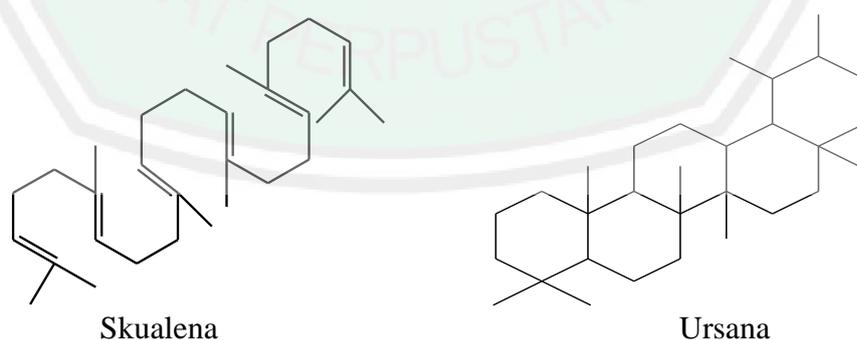
Ikhtimami (2012) menggunakan eluen 2-propanol : air (14:3) dan disemprot dengan anisaldehyde-asam sulfat yang diikuti dengan pemanasan. Menghasilkan noda dengan warna ungu yang menunjukkan adanya saponin akar rambutan tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.).

Wonohadi, *et. al.* (2006) melakukan skrining kandungan kimia secara KLT fraksi etanol rimpang temu giring (*Curcuma heyneana* Val & Van Zijp) dengan menggunakan eluen kloroform : metanol : air (64:50:10) dan pereaksi Lieberman-Burchard (110 °C, 5-10 menit) menunjukkan adanya kandungan saponin. Noda saponin berwarna biru (Rf 0,17). Widriyanti, *et. al.* (2010)

melakukan identifikasi golongan senyawa saponin pada ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocotum* Ruiz dan Pav.) menggunakan eluen kloroform : metanol (95:5) dengan pereaksi Liebermann-Burchard menunjukkan bercak berwarna biru dengan nilai Rf 0,65.

### 2.7.5 Triterpenoid

Triterpenoid merupakan komponen tumbuhan yang mempunyai bau dan dapat diisolasi dari bahan nabati dengan penyulingan sebagai minyak atsiri. Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C<sub>30</sub> asiklik yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang kebanyakan berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat (Harborne, 1987). Senyawa ini paling umum ditemukan pada tumbuhan berbiji, bebas dan sebagai glikosida. Triterpenoid yang paling penting dan paling tersebar luas adalah triterpenoid pentasiklik (Robinson, 1995).



Gambar 2.7 Struktur Golongan Senyawa Triterpenoid (Robinson, 1995)

Menurut Harborne (1987), triterpenoid biasanya terdapat dalam daun dan buah, seperti apel dan per, yang berfungsi sebagai pelindung untuk menolak

serangga dan serangan mikroba. Triterpenoid juga terdapat dalam damar, kulit batang dan getah (*Euphorbia*, *Hevea* dan lain-lain). Triterpenoid tertentu dikenal karena rasanya, terutama kepahitannya. Pereaksi yang umumnya digunakan untuk mendeteksi triterpenoid adalah Lieberman-Burchard yang menghasilkan warna violet.

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan mengenai uji fitokimia untuk senyawa triterpenoid antara lain Sriwahyuni (2010) yang menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard menunjukkan bahwa adanya senyawa triterpenoid karena terbentuk cincin kecoklatan pada ekstrak diklorometana anting-anting (*Acalypha indica* Linn). Rita (2010) juga melakukan uji fitokimia menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard menunjukkan bahwa ekstrak kental n-heksana dan kloroform rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe) positif mengandung triterpenoid.

Indrayani, *et. al.* (2006) melakukan uji fitokimia untuk golongan senyawa triterpenoid pada ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) dengan cara dilarutkan residu dalam 0,5 ml kloroform, lalu ditambah dengan 0,5 ml asam asetat anhidrat. Selanjutnya campuran ini ditetesi dengan 1-2 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung tersebut. Pada semua fraksi yaitu n-heksana, kloroform, etil asetat dan metanol menghasilkan cincin kecoklatan pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid.

Hasil identifikasi Reveny (2011) melakukan identifikasi dengan KLT menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (8:2) diperoleh 2 noda dengan nilai R<sub>f</sub> 0,41 dan 0,29 yang berwarna ungu merah, dan eluen n-heksana : etil asetat (6:4)

diperoleh nilai Rf 0,84 dan 0,76 yang berwarna ungu merah yang menunjukkan adanya senyawa triterpenoid pada ekstrak etanol 80% daun sirih merah (*Piper betle* Linn).

Zahro (2011) melakukan identifikasi dengan KLT pada ekstrak n-heksana anting-anting (*Acalypha indica* Linn) menggunakan eluen n-heksana : kloroform (1:1) dengan pereaksi Lieberman-Burchard menunjukkan nilai Rf 0,32-0,81 yang terpisah dengan baik dan berwarna ungu, merah keunguan dan merah muda di bawah sinar UV 366 nm.

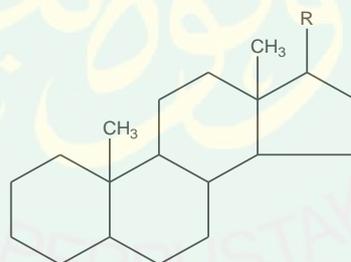
Sriwahyuni (2010) menggunakan eluen benzena : kloroform (3:7) dengan pereaksi Lieberman-Burchard menghasilkan nilai Rf antara 0,16-0,76 dengan 5 noda yang berwarna ungu tua, ungu muda, ungu dan merah keunguan. Berdasarkan warna noda yang dihasilkan tersebut pada ekstrak diklorometana tanaman anting-anting terdapat senyawa triterpenoid.

Aliyan (2012) melakukan identifikasi golongan senyawa triterpenoid dengan KLT pada fraksi petroleum eter biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King) menggunakan eluen benzena : etil asetat (8:2) dengan pereaksi Lieberman-Burchard menunjukkan noda berwarna ungu kehitaman dengan nilai Rf 0,21 menunjukkan golongan senyawa triterpenoid.

#### **2.7.6 Steroid**

Steroid merupakan golongan lipid yang diturunkan dari senyawa jenuh yang dinamakan siklopentanoperhidrofenantrena, yang memiliki inti dengan 3 cincin sikloheksana terpadu dan 1 cincin siklopentana yang tergabung pada ujung cincin sikloheksana tersebut (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994). Steroid tersusun

dari isoprena-isoprena dari rantai panjang hidrokarbon yang menyebabkan sifatnya non polar. Beberapa senyawa steroid mengandung gugus-OH yang sering disebut dengan sterol, sehingga sifatnya yang cenderung lebih polar. Beberapa turunan steroid yang penting ialah steroid alkohol atau sterol. Steroid lain misalnya asam-asam empedu, hormon seks (androgen dan estrogen) dan hormon kortikosteroid. Senyawa steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolesterol. Beberapa senyawa ini jika terdapat dalam tumbuhan akan dapat berperan menjadi pelindung. Senyawa ini tidak hanya bekerja menolak beberapa serangga tetapi juga menarik beberapa serangga lain (Robinson, 1995).



Gambar 2.8 Struktur inti senyawa steroid (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994)

Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada steroid adalah dengan reaksi Liebermann-Burchard yang menghasilkan warna hijau biru. Reaksi warna yang lain pada steroid dilakukan dengan Brieskorn dan Briner (asam klorosulfonat dan Sesolvan NK) menghasilkan warna coklat (Robinson, 1995).

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan mengenai uji fitokimia senyawa steroid antara lain penelitian Sriwahyuni (2010) yang

menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard menunjukkan bahwa adanya senyawa steroid karena terbentuk warna hijau kebiruan pada ekstrak etil asetat dan petroleum eter tanaman anting-anting (*Acalypha indica* Linn). Fitriyani, *et. al.* (2011) mengidentifikasi golongan senyawa steroid dengan uji Salkowski. Pada ekstrak terlihat adanya cincin merah yang menunjukkan adanya senyawa steroid tak jenuh pada ekstrak metanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav).

Hasil identifikasi Sriwahyuni (2010) menggunakan KLT untuk golongan senyawa steroid menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7:3) dengan pereaksi Lieberman-Burchard menghasilkan bahwa pada ekstrak etil asetat anting-anting menunjukkan Rf antara 0,06-0,82 dengan 9 noda yang berwarna hijau kebiruan, hijau, ungu yang tengahnya berwarna biru kehijauan, dan hijau kebiruan muda. Pada ekstrak petroleum eter anting-anting menunjukkan Rf antara 0,52- 0,88 dengan 5 noda yang berwarna biru kehijauan, oranye kecoklatan, sehingga diasumsikan pada ekstrak etil asetat dan petroleum eter anting-anting terdapat senyawa steroid. Hasil identifikasi KLT menggunakan eluen sikloheksana : etil asetat (1:1) dengan pereaksi Lieberman-Burchard menghasilkan bahwa pada ekstrak etil asetat anting-anting menunjukkan Rf antara 0,06-0,86 dengan 12 noda yang berwarna hijau kebiruan, hijau kehitaman, dan ungu yang tengahnya berwarna hijau kebiruan. Pada ekstrak petroleum eter anting-anting menunjukkan Rf antara 0,06-0,84 dengan 7 noda yang berwarna hijau kebiruan dan oranye kecoklatan. Sehingga diasumsikan pada ekstrak etil asetat dan ekstrak petroleum eter anting-anting terdapat golongan senyawa steroid.

Krisyuninda (2012) menggunakan eluen kloroform : aseton (6:5) (v/v) dan berpendar bila diamati dengan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Menunjukkan adanya senyawa steroid pada ekstrak spons *Callyspongia* sp. dengan adanya noda berwarna biru hijau dengan nilai Rf 0,66. Fitriyani, *et. al.* (2011) juga melakukan identifikasi senyawa steroid dengan KLT menggunakan eluen toluena : etil asetat (7:3). Elusi pada ekstrak metanol daun sirih merah menghasilkan tiga noda yang terpisah pada Rf 0,375; 0,75 dan 0,875. Setelah disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat timbul noda berwarna ungu pada Rf tersebut yang menunjukkan adanya senyawa steroid pada ekstrak metanol daun sirih merah.

Aisyah (2008) menggunakan eluen diklorometana : etanol (80:20) dan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat pekat menunjukkan terdapat warna kuning lemon tepat diatas tolan pada KLT setelah dipanaskan, hal ini menunjukkan adanya golongan senyawa sapogenin steroid pada fraksi etil asetat biji kelabet (*Trigonella foenum-graecum*. L.).

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan September 2013 di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan penguap, penjepit kayu, oven, desikator, neraca analitik, pisau, blender, ayakan/ *mesh screen* 40 dan 60 *mesh*, *beaker glass* 500 mL, 250 mL, 100 mL dan 50 mL, *vacuum erlenmeyer* 500 mL, spatula, pengaduk kaca, *shaker*, kertas saring, *aluminium foil*, gunting, penyaring *buchner*, lemari asam, *rotary vacuum evaporator*, corong gelas, gelas arloji, pipet ukur 10 mL, 5 mL dan 1 mL, bola hisap, labu ukur 10 mL, wadah penetasan, *aerator*, lampu neon 18 watt, botol vial, pipet tetes, pipet mikro ukuran 2-20  $\mu\text{L}$  dan ukuran 10 – 100  $\mu\text{L}$ , *vortex*, cawan petri, tabung reaksi, *hot plate*, plat KLT silika G 60 F<sub>254</sub>, pipa kapiler, pinset dan lampu UV.

### 3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah sirsak (*Annona muricata* Linn) yang diperoleh dari Desa Kalilanang Kecamatan Ringinrejo Kabupaten Kediri. Bagian yang digunakan adalah kulit dahan. Bagian tersebut dikeringanginkan kemudian dihaluskan sampai menjadi serbuk. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva udang *Artemia salina* Leach merk UTAH dari Balai Budidaya Air Payau Situbondo.

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini antara lain pelarut n-heksana p.a., kloroform p.a., dan etanol p.a.. Bahan lain yang digunakan adalah air laut, aquades, dimetil sulfoksida, larutan ragi roti, HCl 2%, reagen Dragendorff, reagen Mayer, metanol 50%, serbuk logam Mg, HCl pekat, FeCl<sub>3</sub> 1%, larutan gelatin, HCl 1 N, asam asetat anhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, etil asetat, benzena, dan reagen Lieberman-Burchard.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Sampel kulit dahan sirsak (*Annona muricata* L.) yang telah berbentuk serbuk ditimbang sebanyak 60 g dan diekstraksi secara maserasi bergiliran dengan menggunakan 3 pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda yaitu n-heksana, kloroform, dan etanol. Masing-masing ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40-50 °C, hingga diperoleh 3 ekstrak pekat yakni ekstrak pekat n-heksana, ekstrak pekat kloroform, dan ekstrak pekat etanol.

Ketiga ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya diuji toksisitasnya dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Dengan pengujian ini diketahui tingkat toksisitas masing-masing ekstrak terhadap larva udang *Artemia salina* Leach melalui nilai  $LC_{50}$ . Ekstrak yang memiliki potensi bioaktivitas optimal yaitu memiliki nilai  $LC_{50}$  kecil, diuji kandungan senyawanya melalui uji fitokimia. Pengujian fitokimia dilakukan menggunakan uji reagen untuk mengidentifikasi golongan senyawa yang terkandung dalam masing-masing ekstrak pekat kulit dahan tumbuhan sirsak yang memiliki potensi bioaktivitas. Identifikasi selanjutnya dilakukan dengan KLT berdasarkan kandungan golongan senyawa yang positif dari hasil uji reagen. Hal tersebut untuk mendukung hasil identifikasi adanya kandungan golongan senyawa. Uji golongan senyawa aktif yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi: uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan steroid.

### 3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan dalam pelaksanaan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Analisis kadar air
2. Preparasi sampel
3. Ekstraksi komponen aktif
4. Uji toksisitas dengan larva udang *Artemia salina* Leach
5. Uji fitokimia golongan senyawa aktif dengan uji reagen
6. Identifikasi golongan senyawa aktif dengan KLT

### 3.5 Pelaksanaa Penelitian

#### 3.5.1 Analisis Kadar Air (AOAC, 1984)

Analisis kadar air dilakukan dengan metode pengeringan (*thermogravimetri*). Analisis ini dilakukan untuk sampel segar dan sampel serbuk kering yang dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Cawan yang digunakan dipanaskan dahulu dalam oven pada suhu 100-105 °C selama ± 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian cawan disimpan dalam desikator selama ± 10 menit. Cawan tersebut selanjutnya ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Sampel kulit dahan sirsak dipotong kecil-kecil, dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui beratnya. Sampel kulit dahan sirsak tersebut ditimbang sebanyak 5 g, selanjutnya dikeringkan di dalam oven pada suhu 100-105 °C selama ± 60 menit. Sampel kering didinginkan dalam desikator selama ± 10 menit dan ditimbang. Sampel dipanaskan kembali dalam oven selama ± 30 menit pada suhu yang sama, didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai tercapai berat konstan. Kadar air dalam kulit dahan sirsak dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\% \dots\dots\dots(\text{III.1})$$

Keterangan:  $a$  = berat konstan cawan kosong

$b$  = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

$c$  = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

### 3.5.2 Preparasi Sampel

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit dahan sirsak (*Annona muricata* L.). Sampel berupa kulit dahan dikumpulkan dan dibersihkan dari kotoran yang melekat (Sulianti, *et. al.*, 2006). Selanjutnya dipotong kecil-kecil dan dikeringanginkan dengan cara diletakkan di tempat terbuka dengan sirkulasi udara yang baik dan tidak terkena sinar matahari langsung. Sampel kulit dahan sirsak yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender sehingga menjadi serbuk (Rita, *et. al.*, 2008). Serbuk diayak dengan saringan berukuran 40-60 *mesh* (Rahmawan, 2011). Selanjutnya dikeringkan kembali dalam oven pada suhu 40 °C selama 2 jam untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Ulfa, 2007).

### 3.5.3 Ekstraksi Komponen Aktif

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi/perendaman dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda yaitu n-heksana, kloroform, dan etanol. Serbuk kulit dahan sirsak ditimbang sebanyak 60 g dan direndam dengan 300 mL pelarut n-heksana. Perendaman dilakukan dengan cara sampel dan pelarut dibagi menjadi 2 bagian. Kemudian dilakukan pengadukan yang dibantu dengan *shaker* selama 5 jam (Halimah, 2010) berkekuatan 120 rpm (Mulyawati, 2010) dan direndam selama 24 jam. Kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama sampai diperoleh filtrat yang warnanya pucat. Selanjutnya disaring dan ampasnya dikeringanginkan agar terbebas dari pelarut n-heksana. Filtrat yang diperoleh selanjutnya digabung menjadi satu (Halimah, 2010).

Ampas yang telah kering direndam kembali dengan 300 mL pelarut kloroform. Kemudian dilakukan pengadukan yang dibantu dengan *shaker* selama 5 jam (Halimah, 2010) berkekuatan 120 rpm (Mulyawati, 2010) dan direndam selama 24 jam. Kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama sampai diperoleh filtrat yang warnanya pucat. Selanjutnya disaring dan ampasnya dikeringanginkan agar terbebas dari pelarut kloroform. Filtrat yang diperoleh selanjutnya digabung menjadi satu (Halimah, 2010).

Ampas yang telah kering dimaserasi kembali menggunakan 300 mL pelarut etanol. Kemudian dilakukan pengadukan yang dibantu dengan *shaker* selama 5 jam (Halimah, 2010) berkekuatan 120 rpm (Mulyawati, 2010) dan direndam selama 24 jam. Kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama sampai diperoleh filtrat yang warnanya pucat. Selanjutnya disaring dan ampasnya dikeringanginkan agar terbebas dari pelarut etanol. Filtrat yang diperoleh selanjutnya digabung menjadi satu (Halimah, 2010).

Ketiga filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat n-heksana, kloroform, dan etanol. Hasil ekstrak pekat masing-masing pelarut yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* L. (metode BSLT), uji fitokimia dengan uji reagen terhadap ekstrak kulit dahan sirsak (*Annona muricata* L.) yang memiliki potensi bioaktifitas optimal (nilai  $LC_{50}$  kecil) terhadap larva udang *Artemia salina* L. dan identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

untuk ekstrak yang positif mengandung golongan senyawa tertentu dari hasil uji reagen.

### **3.5.4 Uji Toksisitas dengan Larva Udang *Artemia salina* Leach**

#### **3.5.4.1 Penetasan Telur (McLaughlin, 1991)**

Telur *A. salina* ditetaskan dalam wadah penetas telur dengan dua bagian ruang bersekat, satu bagian ruang gelap dan yang satu terang. Sekat dibuat berlubang dengan diameter 2 mm. Kemudian 250 mL air laut dimasukkan ke dalam wadah, serta diaerasi menggunakan *aerator*. Telur *A. salina* sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam satu ruang, kemudian ruang tersebut ditutup. Ruang yang lain dibiarkan terbuka dan diberi lampu neon 18 watt untuk menarik *A. salina* yang telah menetas melalui lubang sekat. Hal ini dilakukan karena *A. salina* memiliki sifat fototaksis. Telur *A. salina* akan menetas setelah kira-kira 24 jam menjadi larva. Larva yang berumur 48 jam dapat digunakan untuk uji toksisitas.

#### **3.5.4.2 Uji Toksisitas (Meyer, *et. al.*, 1982)**

Ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi pelarut n-heksana, kloroform, dan etanol, kemudian diuji bioaktivitasnya dengan menggunakan larva udang. Pengujian dilakukan dengan 7 variasi konsentrasi, yaitu 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm, serta dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Variasi konsentrasi masing-masing ekstrak tersebut diperoleh dengan terlebih dahulu dibuat larutan stok ekstrak 10000 ppm dengan cara dimasukkan 100 mg ekstrak pekat ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya hingga tanda batas. Selanjutnya larutan yang diperoleh dipipet masing-masing sebanyak 1  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L,

500  $\mu\text{L}$ , dan 1000  $\mu\text{L}$ , kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan pelarutnya diuapkan selama 24 jam. Selanjutnya dimasukkan 100  $\mu\text{L}$  dimetil sulfoksida, 2 mL air laut, dan setetes larutan ragi roti kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Kemudian ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL dan dikocok kembali sampai larutan menjadi homogen. Sehingga konsentrasi masing-masing larutan menjadi 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm. Larutan dengan masing-masing konsentrasi dipindahkan ke dalam botol vial, kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang yang sehat ke dalam botol vial yang telah berisi larutan ekstrak.

Kontrol dibuat dengan cara dimasukkan 100  $\mu\text{L}$  dimetil sulfoksida, 2 mL air laut, dan setetes larutan ragi roti ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian dikocok sampai dapat larut dalam air laut. Kemudian ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL dan dikocok kembali hingga larutan menjadi homogen. Selanjutnya larutan kontrol dipindahkan ke dalam botol vial, kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang yang sehat ke dalam botol vial yang telah berisi larutan kontrol.

Selanjutnya semua botol vial diletakkan di bawah lampu neon 18 watt selama 24 jam dan dihitung jumlah larva *A. salina* yang mati (tidak bergerak aktif). Bila ada kematian pada kontrol dikoreksi dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Tes} - \text{Kontrol}}{\text{Kontrol}} \times 100 \% \dots\dots\dots(\text{III.2})$$

Data yang diperoleh kemudian dianalisa dengan menggunakan *probit analysis method* dari minitab *release* 16 untuk mengetahui *Lethal Concentration* ( $\text{LC}_{50}$ ) dengan selang kepercayaan 95%.

### **3.5.5 Uji Fitokimia Komponen Aktif dengan Uji Reagen (Ciulei, 1984)**

Uji fitokimia kandungan senyawa aktif dengan uji reagen dilakukan pada ekstrak yang memiliki bioaktivitas optimal (nilai  $LC_{50}$  kecil). Uji yang dilakukan meliputi uji golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan triterpenoid/ steroid.

#### **3.5.5.1 Uji Alkaloid**

Ekstrak sampel dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL HCl 2% dan larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff, tabung II ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan pada tabung II terbentuk endapan kekuning-kuningan, menunjukkan adanya alkaloid.

#### **3.5.5.2 Uji Flavonoid**

Ekstrak sampel dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50%. Setelah itu ditambahkan logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk, menunjukkan adanya flavonoid.

#### **3.5.5.3 Uji Tanin**

##### **3.5.5.3.1 Uji dengan $FeCl_3$**

Ekstrak sampel ditambahkan dengan 2-3 tetes larutan  $FeCl_3$  1%. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tua, maka bahan tersebut mengandung tanin.

### 3.5.5.3.2 Uji dengan Larutan Gelatin

Ekstrak sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan larutan gelatin. Jika terbentuk endapan putih, menunjukkan adanya tanin.

### 3.5.5.4 Uji Saponin

Ekstrak sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa ditambahkan HCl 1 N, busa yang terbentuk dapat bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 cm, maka ekstrak positif mengandung saponin.

### 3.5.5.5 Uji Triterpenoid dan Steroid

Ekstrak sampel dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform lalu ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini selanjutnya ditambah dengan 1-2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

### 3.5.6 Identifikasi Komponen Aktif dengan KLT (Gandjar dan Rohman, 2007)

Identifikasi dengan KLT dilakukan terhadap golongan senyawa yang positif dari hasil uji fitokimia dengan uji reagen. Plat KLT yang digunakan adalah plat silika G 60 F<sub>254</sub> (Merck) dibuat ukuran 1 cm x 10 cm. Selanjutnya garis digambar dengan pensil pada bagian bawah plat, untuk menunjukkan posisi awal totalan. Plat KLT silika G 60 F<sub>254</sub> diaktifasi dengan cara dioven pada suhu 100 °C selama 60 menit untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat KLT.

Selanjutnya ekstrak pekat kulit dahan sirsak dilarutkan dengan pelarutnya (dibuat konsentrasi 600–1000 ppm). Kemudian ditotolkan ekstrak sebanyak 1  $\mu$ L (1–10 totol) pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan menggunakan pipa kapiler. Kemudian dikeringkan dengan diangin-anginkan.

Ekstrak yang telah ditotolkan pada plat selanjutnya dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawanya. Setiap golongan senyawa memiliki campuran fase gerak yang berbeda. Sebelum dilakukan elusi setiap campuran fase gerak dimasukkan dalam *great chamber* lalu ditutup rapat dan dilakukan penjuanan selama 20–30 menit. Cara mengetahui eluen sudah jenuh atau belum dapat digunakan kertas saring untuk memeriksanya yaitu dengan membasahi kertas saring dengan uap eluen. Penjuanan ini dilakukan untuk menyamakan tekanan uap pada seluruh bagian bejana. Selanjutnya plat dimasukkan dalam *great chamber* yang berisi fase gerak yang telah jenuh, diletakkan setinggi 0,5 cm dari dasar plat, kemudian *great chamber* ditutup rapat selama  $\pm$  10 menit hingga fase geraknya mencapai jarak  $\pm$  0,5 cm dari tepi atas plat. Kemudian plat diangkat dan dikeringkan dengan diangin-anginkan.

Noda-noda yang terbentuk pada plat silika G 60 F<sub>254</sub> kemudian diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm dan disemprot dengan masing-masing penyemprot golongan senyawanya. Noda yang terbentuk diamati hasil nodanya dengan cara dilingkari dengan pensil (pengamatan noda meliputi jumlah noda, R<sub>f</sub> serta warna noda yang dihasilkan).

Adapun fase gerak dan reagen penguji/ penyemprot golongan senyawa triterpenoid adalah sebagai berikut:

- a. N-heksana : Etil asetat (8:2) dengan pereaksi Lieberman-Burchard menghasilkan noda berwarna ungu merah (Reveny, 2011).
- b. N-heksana : Etil asetat (7:3) dengan pereaksi Lieberman-Burchard menghasilkan noda berwarna ungu, merah keunguan, dan merah muda (Zahro, 2011).
- c. N-heksana : Etil asetat (6:4) dengan pereaksi Lieberman-Burchard menghasilkan noda berwarna ungu merah (Reveny, 2011).
- d. Benzena : Kloroform (3:7) dengan pereaksi Lieberman-Burchard menunjukkan noda berwarna ungu tua, ungu muda, ungu dan merah keunguan (Sriwahyuni, 2010).
- e. Benzena : Etil asetat (8:2) dengan pereaksi Lieberman-Burchard menunjukkan noda berwarna ungu kehitaman (Aliyan, 2012).

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan grafik, kemudian dideskripsikan hasilnya. Tingkat toksisitas larva udang *Artemia salina* Leach dapat diketahui dengan melakukan uji  $LC_{50}$  menggunakan analisis probit pada program MINITAB 16 dengan tingkat kepercayaan 95%.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Analisis Kadar Air

Penentuan kadar air berguna untuk menyatakan kandungan zat dalam tumbuhan sebagai persen bahan kering, Selain itu juga sebagai parameter ketahanan bahan dalam penyimpanan dan sebagai faktor koreksi untuk rendemen (Harjadi, 1993).

Penentuan kadar air pada penelitian ini menggunakan sampel segar dan sampel serbuk kering kulit dahan sirsak, yang dilakukan dengan cara menguapkan air yang ada dalam sampel dengan jalan pemanasan. Kemudian menimbang sampel sampai berat konstan, yang berarti semua air sudah diuapkan. Kandungan air dari masing-masing sampel segar dan sampel serbuk kering dihilangkan dengan pemanasan pada suhu 100-105 °C. Hal ini diungkapkan dalam Harjadi (1993), bahwa air yang terikat secara fisik dapat dihilangkan dengan pemanasan pada suhu 100-105 °C. Penentuan kadar air ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali ulangan dengan tujuan agar diperoleh data yang akurat.

Data perhitungan kadar air sampel kulit dahan sirsak segar ditunjukkan pada Lampiran 4. Hasil pengukuran kadar air pada kulit dahan sirsak segar dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kadar air yang terkandung dalam sampel kulit dahan sirsak segar

Sampel	Kadar Air yang Terkandung (%)			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	Rata-rata
Kulit Dahan Sirsak Segar	64,75	64,95	64,67	64,79

Kandungan air dalam kulit dahan sirsak segar cukup tinggi yaitu 64,79 %. Kadar air sampel segar bertujuan untuk mengetahui kadar air sesungguhnya dari kulit dahan sirsak segar. Sehingga nantinya dapat digunakan acuan untuk penelitian selanjutnya apabila ingin mengekstraksi kulit dahan sirsak dalam keadaan segar.

Berdasarkan penjelasan yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa penentuan kadar air salah satunya berguna untuk mengetahui ketahanan suatu bahan yang akan disimpan agak lama. Dengan diketahui tingginya kadar air sampel segar tersebut maka perlu untuk dilakukan pengeringan pada sampel. Karena pengeringan pada sampel dimaksudkan untuk mengurangi kandungan air dalam bahan. Kandungan air yang tinggi dalam suatu bahan dapat mendorong terjadinya reaksi enzimatik yang mengakibatkan terjadinya perubahan-perubahan kimia. Perubahan komposisi kimia terutama pada senyawa-senyawa berkhasiat dapat menurunkan mutu sampel yang dihasilkan. Di samping itu, kandungan air yang tinggi merupakan media bagi tumbuhnya mikroorganisme atau jamur yang dapat mencemari bahan. Untuk menanggulangnya maka kulit dahan sirsak segar harus dikeringkan terlebih dahulu karena kadar air yang kecil memungkinkan untuk penyimpanan bahan yang relatif lama.

Sampel serbuk kulit dahan sirsak kering juga dilakukan penentuan kadar airnya. Data perhitungan kadar air sampel serbuk kulit dahan sirsak kering ditunjukkan pada Lampiran 4. Hasil pengukuran kadar air pada serbuk kulit dahan sirsak kering dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Kadar air yang terkandung dalam sampel serbuk kulit dahan sirsak kering

Sampel	Kadar Air yang Terkandung (%)			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	Rata-rata
Serbuk Kulit Dahan Sirsak Kering	8,77	8,32	8,55	8,55

Kandungan air dalam serbuk kulit dahan sirsak kering cukup rendah yaitu 8,55 %. Hasil tersebut masih di bawah 10% sehingga sampel dapat disimpan dalam waktu relatif lama. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Winarno (1997), apabila kadar air suatu bahan kurang dari 10%, pertumbuhan mikroba dapat dihindari sehingga bahan dapat disimpan dalam waktu relatif lama.

Selain itu penentuan kadar air juga berfungsi sebagai koreksi rendemen. Karena kadar air berpengaruh terhadap proses pelepasan senyawa metabolit sekunder pada sampel saat proses ekstraksi. Kadar air yang tinggi akan mengurangi rendemen ekstrak yang akan diperoleh.

#### 4.2 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn) yang diperoleh dari Desa Kalilanang, Kecamatan

Ringinrejo, Kabupaten Kediri. Sampel kulit dahan sirsak segar dikumpulkan dan dibersihkan dari kotoran yang melekat, yang dapat mengganggu dalam proses ekstraksi. Selanjutnya dipotong kecil-kecil untuk memperbesar luas permukaan sehingga mempercepat proses pengeringan. Kemudian dikeringanginkan selama 4 hari dengan cara diletakkan di tempat terbuka dengan sirkulasi udara yang baik dan tidak terkena sinar matahari langsung. Pengeringan dilakukan dengan diangin-anginkan pada suhu ruang agar kandungan senyawa kimia yang terdapat pada sampel kulit dahan sirsak tidak mengalami kerusakan. Pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air, menghentikan reaksi enzimatik, dan mencegah tumbuhnya jamur sehingga dapat disimpan lebih lama (pengawetan) dan tidak mudah rusak sehingga komposisi kimianya tidak mengalami perubahan (Harborne, 1987).

Sampel kulit dahan sirsak yang sudah kering tersebut kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender sehingga menjadi serbuk. Kemudian serbuk diayak dengan saringan berukuran 40-60 *mesh*. Penghalusan hingga menjadi serbuk berfungsi untuk memperbesar luas permukaan, sehingga mempermudah proses ekstraksi. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Octavia (2009), bahwa dengan meningkatnya tingkat kehalusan, maka luas permukaan yang terkena cairan ekstraksi akan semakin besar. Serbuk dengan penghalusan yang tinggi kemungkinan sel-sel yang rusak juga semakin besar, sehingga memudahkan pengambilan bahan kandungan langsung oleh bahan pelarut. Sedangkan pengayakan berukuran 40-60 *mesh* dilakukan untuk menseragamkan ukuran serbuk. Selanjutnya sampel serbuk kulit dahan sirsak dikeringkan kembali

dalam oven pada suhu 40 °C selama 2 jam untuk digunakan pada tahap selanjutnya. Pengeringan kembali tersebut bertujuan agar diperoleh sampel yang benar-benar kering, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang relatif lama.

#### 4.3 Ekstraksi Komponen Aktif

Ekstraksi komponen aktif adalah tahap yang sangat penting dalam memperoleh metabolit sekunder tumbuhan untuk proses penelitian. Dalam metode ekstraksi bahan alam, dikenal suatu metode maserasi yaitu metode perendaman. Penekanan utama dalam metode ini adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dengan jaringan yang diekstraksi (Guenther, 1987). Ekstraksi beberapa senyawa metabolit sekunder dari kulit dahan tumbuhan sirsak (*Annona muricata* L.) pada penelitian ini menggunakan ekstraksi maserasi untuk mengantisipasi senyawa yang rentan terhadap panas.

Metode maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling mudah dan cepat. Metode ini tidak membutuhkan suhu tinggi sehingga cocok untuk mengekstrak bahan yang tidak tahan panas (komponen volatil). Metode ekstraksi maserasi dilakukan dengan cara merendam sampel dalam pelarut organik. Pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif akan larut. Karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel (Cheong, 2005).

Ekstraksi maserasi pada penelitian ini dilakukan dengan cara merendam sampel serbuk kulit dahan sirsak dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda yaitu n-heksana, kloroform, dan etanol. Menurut Meloan (1999) bahwa ekstraksi senyawa aktif dari suatu jaringan tumbuhan menggunakan berbagai jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda bertujuan memperoleh hasil yang optimum, baik dalam jumlah ekstrak maupun senyawa aktif yang terkandung dalam sampel.

Menurut Hostetmann, *et. al.* (1997), secara umum ekstraksi dilakukan secara berturut-turut mulai dengan pelarut nonpolar (n-heksana) selanjutnya dengan pelarut semipolar (kloroform) kemudian dengan pelarut polar (etanol). Dengan demikian akan diperoleh ekstrak yang mengandung berturut-turut senyawa nonpolar, semipolar, dan polar. Karena berdasarkan Khopkar (2003), bahwa prinsip pelarutan yang dipakai pada metode ini adalah *like dissolve like* artinya pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut nonpolar akan melarutkan senyawa nonpolar.

Ekstraksi maserasi dilakukan dengan merendam sampel serbuk kulit dahan sirsak sebanyak 60 g dalam 300 mL pelarut n-heksana. Perendaman dilakukan dengan cara sampel dibagi menjadi 2 bagian. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Nur dan Adjuwana (1989), bahwa ekstraksi beberapa kali dengan pelarut yang lebih sedikit akan lebih efektif dibanding ekstraksi satu kali dengan semua pelarut sekaligus. Perbandingan antara sampel serbuk tumbuhan dengan pelarut yang digunakan adalah 1:5. Menurut Balsamah (2006), bahwa nisbah

pelarut 1:5 akan mencapai kesetimbangan konsentrasi yang terbentuk pada saat ekstraksi sehingga jumlah ekstrak yang diperoleh akan semakin banyak.

Proses maserasi perlu disertai pengadukan agar terjadi interaksi yang merata antara cairan penyari dengan seluruh permukaan masing-masing serbuk. Pada penelitian ini dilakukan pengadukan yang dibantu dengan *shaker* selama 5 jam dengan kekuatan 120 rpm. Selain itu menurut Cannell (1998), pengadukan pada proses maserasi ditujukan untuk meningkatkan efisiensi metode maserasi supaya kejenuhan pelarut terjadi lebih cepat dan maserat yang diperoleh lebih homogen. Pelarut akan dapat mengalir secara berulang-ulang ke dalam serbuk halus sehingga memungkinkan adanya interaksi antara pelarut dengan serbuk. Kejenuhan terjadi apabila tidak ada perbedaan konsentrasi. Perpindahan pelarut atau zat terlarut dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah tidak terjadi apabila konsentrasi di dalam dan diluar sel dalam kondisi yang seimbang.

Waktu yang digunakan untuk merendam sampel selama 24 jam. Waktu tersebut merupakan waktu yang cukup efektif untuk interaksi antara pelarut dengan jaringan yang diekstraksi. Karena menurut Yuliani dan Rusli (2003), semakin lama waktu ekstraksi maka kesempatan untuk bersentuhan antara bahan dengan pelarut semakin besar, akibatnya rendemen yang dihasilkan akan bertambah. Maserasi dengan n-heksana dilakukan hingga 3 kali selama 24 jam atau sampai diperoleh filtrat yang warnanya pucat, dengan asumsi bahwa senyawa yang dikehendaki telah terambil dalam rentang waktu tersebut. Perubahan filtrat yang diperoleh dari warna kuning pekat hingga kuning pucat sebagaimana pada Tabel 4.3.

Ampas yang telah kering atau terbebas dari pelarut n-heksana direndam kembali dengan 300 mL pelarut kloroform dengan proses sama seperti pada pelarut n-heksana. Begitu pula dilakukan proses yang sama untuk pelarut etanol. Maserasi dengan pelarut kloroform dan etanol dilakukan hingga 3 kali selama 24 jam atau sampai diperoleh filtrat yang warnanya pucat. Perubahan filtrat yang diperoleh untuk pelarut kloroform dari warna hijau kehitaman pekat hingga hijau kehitaman pucat dan untuk pelarut etanol dari warna coklat tua pekat hingga coklat tua pucat sebagaimana pada Tabel 4.3. Ekstraksi maserasi tersebut dihentikan sampai filtrat berwarna pucat, diharapkan senyawa-senyawa yang memiliki kepolaran yang sesuai dengan masing-masing pelarut ini dapat terekstrak secara maksimal pada masing-masing pelarutnya.

Filtrat atau ekstrak cair hasil maserasi masing-masing pelarut yang telah diperoleh selanjutnya diuapkan pelarutnya dengan *rotary vacuum evaporator* untuk mendapatkan ekstrak pekat yang akan digunakan untuk pengujian selanjutnya. *Rotary vacuum evaporator* merupakan alat yang menggunakan prinsip penurunan tekanan sehingga pelarut dapat menguap pada suhu di bawah titik didihnya. *Rotary vacuum evaporator* lebih disukai karena mampu menguapkan pelarut dibawah titik didih sehingga senyawa-senyawa yang terkandung di dalam pelarut tidak rusak oleh suhu yang tinggi.

Penguapan pelarut terjadi karena adanya pemanasan yang dipercepat oleh putaran dari labu alas bulat dan dibantu dengan penurunan tekanan oleh pompa vakum. Uap pelarut akan naik ke kondensor dan mengalami kondensasi menjadi

molekul-molekul cairan pelarut murni yang ditampung di dalam labu alas bulat penampung.

Proses pemekatan filtrat atau ekstrak cair yang akan diuapkan dimasukkan ke dalam labu alas bulat dengan volume  $\frac{2}{3}$  bagian dari volume labu alas bulat yang digunakan, kemudian *waterbath* dipanaskan sesuai dengan suhu titik didih masing-masing pelarut yaitu 40-50 °C. Setelah suhu tercapai, labu alas bulat yang telah berisi sampel dipasang dengan kuat pada ujung rotor yang menghubungkan dengan kondensor. Selanjutnya labu alas bulat, aliran air pendingin dan pompa vakum dijalankan.

Penguapan pelarut dengan *rotary vacuum evaporator* dihentikan sampai diperoleh ekstrak yang cukup pekat, selanjutnya pelarut yang masih ada dalam ekstrak diuapkan dalam desikator vakum. Perhitungan rendemen hasil ekstraksi sampel serbuk kulit dahan sirsak ditunjukkan pada Lampiran 5. Hasil ekstraksi sampel serbuk kulit dahan sirsak dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil ekstraksi sampel serbuk kulit dahan sirsak kering

Pelarut	Volume Pelarut (mL)	Perubahan Filtrat	Warna Ekstrak Pekat	Rendemen (%) (b/b)
N-heksana	900	kuning pekat menjadi kuning pucat	kuning kehijauan	1,30
Kloroform	900	hijau kehitaman pekat menjadi hijau kehitaman pucat	hijau kehitaman	1,56
Etanol	900	coklat tua pekat hingga coklat tua pucat	coklat tua	6,28

Perhitungan rendemen dilakukan untuk mengetahui banyaknya metabolit sekunder dalam kulit dahan sirsak yang dapat terekstrak oleh masing-masing pelarut. Dari Tabel 4.3 dapat diketahui bahwa hasil ekstrak pekat yang diperoleh dari proses ekstraksi paling banyak dihasilkan dari sampel yang dilarutkan dalam pelarut etanol, sedangkan hasil ekstrak yang diperoleh dari sampel yang dilarutkan dalam pelarut n-heksana dan kloroform memiliki kecenderungan yang sama. Hal tersebut menunjukkan bahwa kandungan senyawa-senyawa polar dalam sampel serbuk kulit dahan sirsak lebih besar daripada senyawa-senyawa semipolar dan nonpolar. Hasil ekstrak pekat masing-masing pelarut yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* L. (metode BSLT), uji fitokimia dengan uji reagen terhadap ekstrak kulit dahan sirsak (*Annona muricata* L.) yang memiliki potensi bioaktivitas optimal (nilai  $LC_{50}$  kecil) terhadap larva udang *Artemia salina* L. dan identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk ekstrak yang positif mengandung golongan senyawa tertentu dari hasil uji reagen.

#### **4.4 Uji Toksisitas dengan Larva Udang *Artemia salina* Leach**

Uji toksisitas merupakan uji pendahuluan untuk mengamati aktivitas farmakologi suatu senyawa (Hamburger dan Hostettmann, 1991). Salah satu uji toksisitas menurut Meyer *et. al.* (1982) adalah uji bioaktivitas menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach dikenal dengan istilah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). BSLT adalah suatu metode penelusuran untuk menentukan bioaktivitas suatu ekstrak ataupun senyawa terhadap larva udang *A. salina*.

Larva udang *Artemia salina* Leach memiliki kulit yang tipis dan peka terhadap lingkungannya, sehingga ia banyak digunakan dalam uji toksisitas. Zat atau senyawa asing yang ada di lingkungannya akan terserap ke dalam tubuhnya secara difusi dan langsung mempengaruhi kehidupannya. Larva udang yang sensitif ini akan mati apabila zat atau senyawa asing tersebut bersifat toksik (Hamburger dan Hostettmann, 1991).

Senyawa aktif yang memiliki daya bioaktivitas tinggi diketahui berdasarkan nilai *Lethal Concentration* 50 % ( $LC_{50}$ ), yaitu suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat menyebabkan kematian hewan uji sampai 50 %. Data mortalitas yang diperoleh kemudian diolah dengan probit analisis yang dirumuskan oleh Finney (1971) untuk menentukan nilai  $LC_{50}$  pada derajat kepercayaan 95 %. Senyawa kimia berpotensi bioaktif jika mempunyai nilai  $LC_{50}$  kurang dari 1.000 ppm (Meyer, *et. al.*, 1982).

#### 4.4.1 Penetasan Telur

Proses penetasan telur *Artemia salina* Leach pada penelitian ini digunakan wadah penetasan dengan dua bagian ruang bersekat, satu bagian ruang gelap dan yang satu terang. Sekat dibuat berlubang dengan diameter 2 mm. Penetasan telur dilakukan dengan menggunakan air laut sebanyak 250 mL yang dimasukkan ke dalam wadah penetasan serta diaerasi menggunakan *aerator*. Telur *A. salina* sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam satu ruang, kemudian ruang tersebut ditutup. Aerasi tersebut bertujuan untuk memberikan oksigen yang cukup bagi kelangsungan hidup *A. salina*, sehingga kadar oksigen yang terlarut akan terjaga.

Telur *A. salina* tersebut akan sulit menetas jika oksigen yang terlarut dalam air laut kurang.

Pada wadah penetas ruang yang lain dibiarkan terbuka dan diberi penerangan dengan lampu neon 18 watt. Penerangan selama proses penetasan berfungsi untuk menjaga kondisi air laut agar tetap hangat, sehingga mempercepat proses penetasan. Karena berdasarkan Opinion (2013), apabila telur-telur *A. salina* yang kering direndam dalam air laut dengan suhu 25 °C, maka akan menetas dalam waktu 24–36 jam. Larva akan keluar dari dalam cangkang yang dikenal dengan nama nauplius. Selain itu, penerangan tersebut juga berfungsi agar *A. salina* yang telah menetas bergerak menuju cahaya, sehingga terpisah dari cangkang telurnya. Hal ini dilakukan karena *A. salina* memiliki sifat fototaksis. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Emslie (2013) bahwa *A. salina* memiliki perilaku fototaksis positif yang berarti menyukai cahaya, di alam dibuktikan dengan gerakan tubuh menuju ke permukaan karena matahari sebagai sumber cahaya alami, dimana akan selalu di permukaan saat siang hari dan tenggelam pada malam hari.

Telur *A. salina* akan menetas setelah kira-kira 24 jam menjadi larva. Larva yang berumur 48 jam dapat digunakan untuk uji toksisitas. Karena menurut Meyer, *et. al.* (1982), telur *A. Salina* akan menetas sempurna menjadi larva dalam waktu 24 jam. *A. salina* yang baik digunakan untuk uji BSLT adalah yang berumur 48 jam sebab jika lebih dari 48 jam dikhawatirkan kematian *A. Salina* bukan disebabkan toksisitas ekstrak, melainkan oleh terbatasnya persediaan makanan. Selain itu, larva udang yang berumur 48 jam berada pada kondisi yang

paling peka terhadap kondisi lingkungan. Hal ini disebabkan dinding sel larva masih lunak, sehingga senyawa asing dalam air laut yang diserap melalui dinding selnya akan segera mempengaruhi hidup larva tersebut. Senyawa asing yang bersifat toksik akan mengakibatkan kematian pada larva udang tersebut.

#### 4.4.2 Uji Toksisitas

Hasil ekstrak pekat masing-masing pelarut n-heksana, kloroform, dan etanol yang diperoleh selanjutnya dilakukan uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach (metode BSLT). Masing-masing larutan ekstrak n-heksana, kloroform, dan etanol dibuat dengan variasi konsentrasi yaitu 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm. Sepuluh larva udang *Artemia salina* Leach digunakan sebagai hewan uji toksisitas dalam setiap konsentrasi masing-masing ekstrak. Perlakuan uji toksisitas ini dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan untuk mendapatkan data yang akurat.

Variasi konsentrasi masing-masing ekstrak tersebut diperoleh dengan terlebih dahulu dibuat larutan stok ekstrak 10000 ppm. Larutan uji dibuat dari larutan stok 10000 ppm dengan cara dipipet 1  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$ , dan 1000  $\mu\text{L}$  masing-masing ekstrak ke dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya pelarut masing-masing ekstrak diuapkan sampai kering selama 24 jam agar kematian larva tidak dipengaruhi oleh pelarutnya.

Setelah pelarutnya mengering, dimasukkan 100  $\mu\text{L}$  dimetil sulfoksida, 2 mL air laut, dan setetes larutan ragi roti kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Kemudian ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL dan dikocok kembali sampai larutan menjadi homogen. Sehingga

konsentrasi masing-masing larutan menjadi 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm. Selanjutnya larutan dengan masing-masing konsentrasi dipindahkan ke dalam botol vial, kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang yang sehat ke dalam botol vial yang telah berisi larutan ekstrak.

Larutan ekstrak dengan air laut sering menimbulkan masalah karena adanya perbedaan tingkat kepolaran, ekstrak tidak mampu larut dengan air laut sehingga digunakan DMSO untuk melarutkannya (Colegate dan Molyneux, 2007). DMSO digunakan sebagai surfaktan karena ekstrak tidak dapat larut dalam air laut. Surfaktan merupakan senyawa yang memiliki ujung hidrofilik dan hidrofobik sehingga dapat melarutkan ekstrak dengan air laut. DMSO merupakan surfaktan yang paling baik dan kadar minimal yang sudah dapat melarutkan ekstrak tanpa menimbulkan efek toksis adalah 20  $\mu$ l/ 5 ml.

Homogenitas larutan ekstrak yang diujikan menjadi kunci utama tercapainya konsentrasi yang diinginkan. Oleh karena itu, pertama ekstrak dilarutkan terlebih dahulu dalam pelarutnya masing-masing dan juga digunakan DMSO sebagai surfaktan untuk melarutkan ekstrak sebelum dilarutkan lebih lanjut dengan air laut. Selain itu, pengocokan juga perlu dilakukan untuk menghomogenkan larutan sehingga konsentrasi yang diinginkan dapat tercapai.

Larutan ragi roti dalam pengujian terhadap larva udang ini berguna sebagai sumber makanan *A. salina*. Dibuat dalam bentuk larutan karena *A. salina* hanya dapat menelan makanan yang berukuran kecil yaitu kurang dari 50 mikron dan *A. salina* akan menelan makanannya secara langsung. Mudjiman (1989) menyebutkan bahwa makanan *A. salina* terdiri atas ganggang renik, bakteri dan

cendawan. Dalam pemeliharaan makanan yang diberikan adalah katul padi, tepung terigu, tepung kedelai, dan ragi. Berdasarkan pernyataan tersebut dalam penelitian ini digunakan ragi roti.

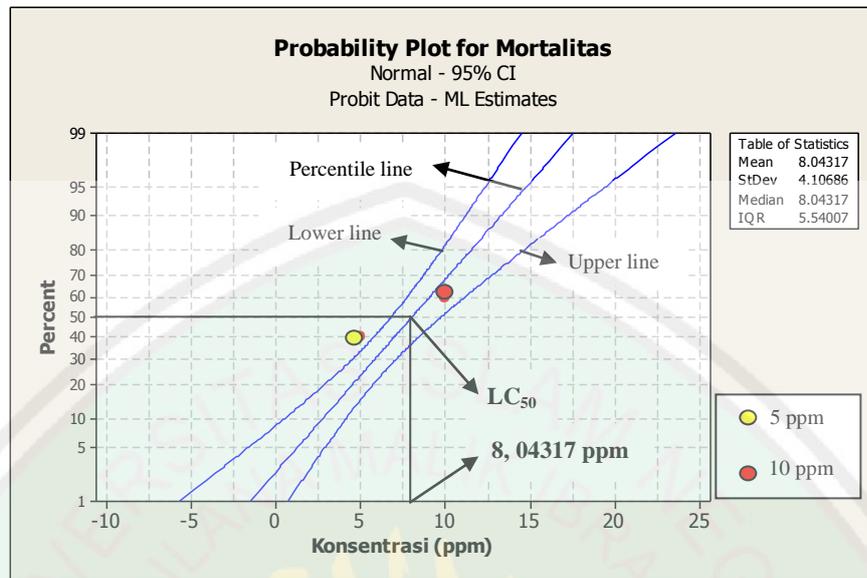
Meyer, *et. al.* (1982) memaparkan konsentrasi larutan ragi roti yang digunakan, yaitu 3 mg ragi roti dilarutkan dalam 5 mL air laut. Adapun pemberian larutan ragi roti tersebut cukup satu tetes, tidak boleh lebih. Hal ini disebabkan karena sebagai *filter feeder* (penyaring makanan), *A. salina* menelan apa saja yang berukuran kecil. *A. salina* tidak bisa membedakan antara makanan dan bukan makanan. Jika pemberian makanan terlalu banyak, jumlah yang ditelan semakin banyak. Apabila terjadi demikian maka makanan yang belum sempat dicernakan akan terdesak oleh makanan baru yang terus menerus masuk dalam jumlah yang banyak. Dengan demikian, makanan itu akan keluar lagi dari usus dalam keadaan belum tercerna dengan baik dan belum sempat diserap sarinya oleh usus. Hal ini dapat menyebabkan kematian *A. salina*, sehingga jumlah kematian larva yang didapatkan bukan merupakan hasil yang sebenarnya karena pengaruh ekstrak kulit dahan sirsak.

Setiap masing-masing ekstrak pada uji toksisitas ini selalu dibuat larutan kontrol dengan cara yang sama kecuali penambahan ekstrak, yaitu dengan cara dimasukkan 100  $\mu$ L dimetil sulfoksida, 2 mL air laut, dan setetes larutan ragi roti ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian dikocok sampai dapat larut dalam air laut. Kemudian ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL dan dikocok kembali hingga larutan menjadi homogen. Selanjutnya larutan kontrol dipindahkan ke dalam botol vial, kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang yang

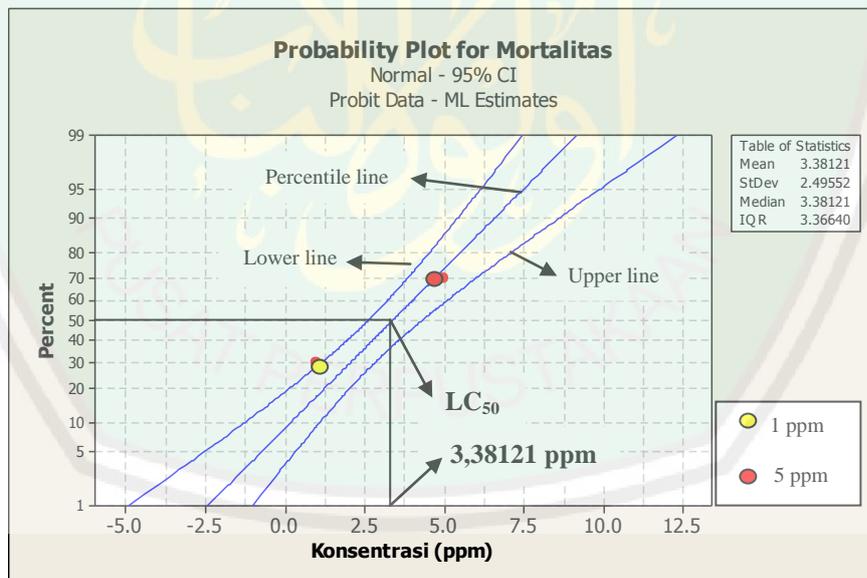
sehat ke dalam botol vial yang telah berisi larutan kontrol. Selanjutnya Semua botol vial diletakkan di bawah lampu neon 18 watt selama 24 jam dan dihitung jumlah larva *A. salina* yang mati (tidak bergerak aktif).

Parameter yang digunakan untuk menunjukkan adanya aktivitas biologis suatu senyawa pada *A. salina* adalah kematian. Setelah 24 jam, larva yang hidup dihitung. Dikatakan hidup jika larva masih bergerak aktif, sekecil apapun gerakan tersebut. Larva tidak mungkin diam, sebab selain berfungsi sebagai alat gerak, antena II pada larva juga berfungsi sebagai alat pernafasan. Setelah jumlah larva yang hidup diketahui, jumlah larva yang mati dapat dihitung. Kemudian dihitung persen kematian pada masing-masing konsentrasi perlakuan dan kontrol. Kontrol digunakan untuk mengoreksi kematian larva yang bukan disebabkan oleh pengaruh ekstrak kulit dahan sirsak.

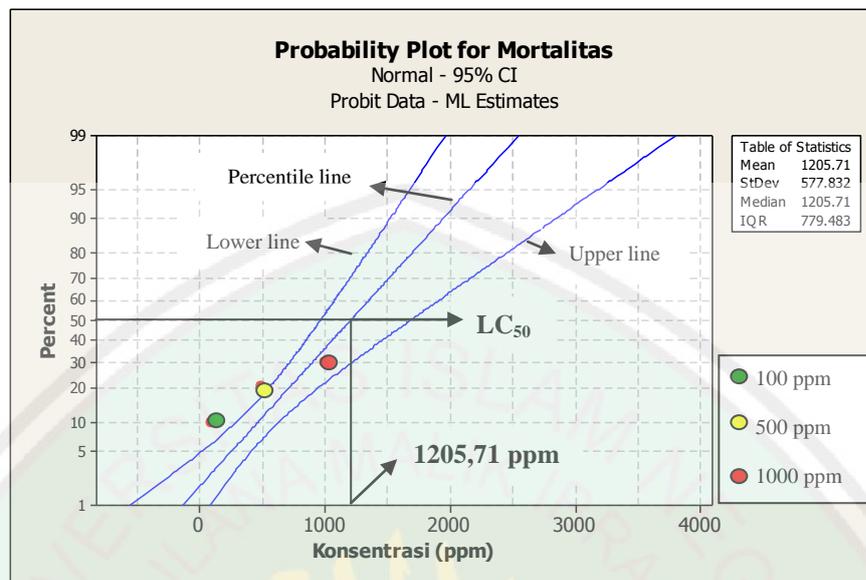
Hasil uji toksisitas ekstrak n-heksana, kloroform, dan etanol kulit dahan sirsak dan hasil analisa dengan program Minitab 16 dengan kepercayaan 95 % dapat dilihat pada Lampiran 6. Kurva mortalitas larva udang dapat dilihat pada Gambar 4.1, 4.2, dan 4.3.



Gambar 4.1 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach ekstrak n-heksana dengan nilai  $LC_{50} = 8,04317$  ppm



Gambar 4.2 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach ekstrak kloroform dengan nilai  $LC_{50} = 3,38121$  ppm



Gambar 4.3 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach ekstrak etanol dengan nilai  $LC_{50} = 1205,71$  ppm

Berdasarkan gambar di atas menunjukkan kurva hubungan antara konsentrasi larutan uji (sumbu x) dan persen mortalitas (sumbu y), yang terlihat bahwa semakin besar nilai konsentrasi masing-masing ekstrak maka mortalitas terhadap *A. salina* juga semakin besar. Pada masing-masing kurva terdapat tiga garis yakni *lower line*, *percentile line*, dan *upper line*. Garis bawah (*lower line*) adalah batas bawah yang menunjukkan konsentrasi terendah pada setiap persen mortalitas. Garis tengah (*percentile line*) menunjukkan konsentrasi pada setiap persen mortalitas atau disebut juga garis normal karena menunjukkan ada tidaknya hubungan linear antara konsentrasi dan persen mortalitas. Dan garis atas (*upper line*) adalah batas atas yang menunjukkan konsentrasi tertinggi pada setiap persen mortalitas.

Berdasarkan ketiga kurva di atas menunjukkan pada setiap kurva hanya terdapat beberapa titik konsentrasi yang muncul. Pada Gambar 4.1 dan Gambar

4.2 terdapat dua titik konsentrasi yang muncul, dan pada Gambar 4.3 terdapat tiga titik yang muncul. Hal tersebut disebabkan karena pada konsentrasi 0 ppm tidak ada larva yang diuji mati, sedangkan pada konsentrasi tertentu semua larva yang diuji mati. Pada keadaan tersebut titik konsentrasi pada kurva tidak muncul. Apabila pada konsentrasi tertentu semua larva yang diuji mati atau pada konsentrasi tertentu persen kematiannya telah mencapai 100 % dan pada konsentrasi selanjutnya semua larva yang diuji juga mati, maka persen kematiannya akan konstan (data *uniform*).

Berdasarkan kurva mortalitas larva udang *A. salina* ketiga ekstrak n-heksana, kloroform, dan etanol masing-masing diperoleh nilai  $LC_{50}$  yang dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Nilai  $LC_{50}$  masing-masing ekstrak kulit dahan sirsak

Ekstrak	Nilai $LC_{50}$ (ppm)	Kategori
N-heksana	8,04317	Sangat toksik
Kloroform	3,38121	Sangat toksik
Etanol	1205,71	Tidak toksik

Ekstrak n-heksana dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 8,04317 ppm termasuk dalam kategori sangat toksik. Sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak n-heksana memiliki potensi mengandung senyawa bioaktif karena mampu mengakibatkan kematian 50% larva udang sebagai hewan uji dengan konsentrasi cukup rendah (< 1000 ppm). Pada Lampiran 6 menunjukkan output dari hasil analisis probit dengan minitab 16 yang berupa tampilan *Regression Table*. Dari output tersebut menunjukkan bahwa untuk variabel mortalitas (*Standard error* = 0,0420045;

$Z_{hitung} = 5,80$ ; dan nilai  $p = 0,000$ ) memiliki nilai *Standard error* kecil dan nilai  $p$  yang kurang dari 0,05 yang menandakan bahwa model analisis probit untuk ekstrak n-heksana dapat diterima. Karena dalam analisis probit, model probit dapat diterima apabila pada *Regression Table* nilai *Standard error* kecil,  $Z_{hitung} \neq 0$ , dan nilai  $p$  kurang dari 0,05.

Ekstrak kloroform dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 3,38121 ppm juga termasuk dalam kategori sangat toksik. Dengan nilai *Standard error* = 0,0643677;  $Z_{hitung} = 6,23$ ; dan nilai  $p = 0,000$  menandakan bahwa model analisis probit untuk ekstrak kloroform dapat diterima. Sedangkan ekstrak etanol dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 1205,71 ppm termasuk dalam kategori tidak toksik. Karena pada konsentrasi hingga 1000 ppm ekstrak etanol belum mampu mengakibatkan kematian 50% larva udang sebagai hewan uji. Dengan nilai *Standard error* = 0,0003318;  $Z_{hitung} = 5,22$ ; dan nilai  $p = 0,000$  menandakan bahwa model analisis probit untuk ekstrak etanol dapat diterima. Untuk output dari hasil analisis probit dengan minitab 16 yang berupa tampilan *Regression Table* dapat dilihat pada Lampiran 6.

Pengujian *bioassay* merupakan suatu pengujian yang memerlukan ketelitian yang tinggi, karena banyak faktor yang dapat mempengaruhi kematian larva udang *A. Salina*. Oleh karena itu, dalam melakukan uji toksisitas dari masing-masing ekstrak kulit dahan sirsak selalu dibuat kontrol. Kontrol dibuat sama dengan larutan uji hanya saja tidak menggunakan ekstrak. Dalam penelitian ini kontrol tidak menyebabkan kematian pada *A. Salina*, sehingga bisa dikatakan bahwa pengaruh penambahan DMSO sebagai surfaktan dapat diabaikan. Selain

itu, kondisi lingkungan tempat tumbuh *A. salina* dinilai cukup baik sehingga tidak menyebabkan kematian.

Hasil  $LC_{50}$  ketiga ekstrak tersebut menunjukkan bahwa tingkat toksisitas senyawa dalam ekstrak kloroform lebih besar daripada ekstrak n-heksana, sedangkan ekstrak etanol tidak toksik. Hal tersebut berkaitan dengan kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam kedua ekstrak kulit dahan tumbuhan sirsak yang diasumsikan mengandung golongan senyawa triterpenoid. Mekanisme senyawa aktif dalam mempengaruhi kehidupan *A. salina* adalah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Bila senyawa aktif ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini juga menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Akibatnya, larva gagal mendapatkan stimulus rasa yang mengakibatkan larva tidak mampu mengenali makanannya sehingga larva mati kelaparan (Padua, *et. al.*, 1999). Berdasarkan pernyataan Meyer, *et. al.* (1982), *A. salina* memiliki keadaan membran kulit yang tipis sehingga memungkinkan terjadinya difusi senyawa aktif dari lingkungan yang dapat mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya.

Berdasarkan beberapa penelitian bagian-bagian yang lain dari tumbuhan sirsak yang telah dilakukan dengan uji toksisitas terhadap *A. salina* diantaranya penelitian Iskandar, *et. al.* (2012) menunjukkan bahwa fraksi n-heksana dan ekstrak etanol daun sirsak memiliki tingkat toksisitas yang tinggi dengan nilai  $LC_{50}$  masing-masing 5,394 ppm dan 21,511 ppm. Hasil penelitian Sinurat (2011) juga menunjukkan ekstrak n-heksana dan etanol daun sirsak memiliki tingkat toksisitas yang tinggi dengan nilai  $LC_{50}$  masing-masing 3,66 ppm dan 0,73 ppm.

Hasil penelitian Putri (2013) yang telah melakukan uji toksisitas ekstrak bunga sirsak terhadap *A. salina* menunjukkan nilai  $LC_{50}$  masing-masing ekstrak n-heksana 2,916 ppm, ekstrak kloroform 6,627 ppm, dan ekstrak etanol 833,400 ppm. Dan hasil penelitian Nasliyana (2013) yang telah melakukan uji toksisitas fraksi n-heksana dan kloroform biji sirsak menunjukkan nilai  $LC_{50}$  masing-masing 21,8975 ppm dan 2,4667 ppm.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa tingkat toksisitas ekstrak masing-masing bagian tumbuhan sirsak berbeda. Hal tersebut berkaitan dengan intensitas kandungan senyawa aktif yang terdapat pada masing-masing bagian tumbuhan sirsak berbeda dan efektivitas pelarut yang digunakan untuk mengekstrak senyawa aktif juga berbeda. Pada hasil uji toksisitas penelitian ini, ekstrak n-heksana kulit dahan sirsak menunjukkan nilai  $LC_{50}$  8,043 ppm yang memiliki kecenderungan tingkat toksisitas yang sama dengan hasil fraksi n-heksana daun sirsak dengan nilai  $LC_{50}$  5,394 ppm yang telah dilakukan oleh Iskandar, *et. al.* (2012). Dan untuk ekstrak kloroform kulit dahan sirsak menunjukkan nilai  $LC_{50}$  3,3812 ppm yang memiliki kecenderungan tingkat toksisitas yang sama dengan hasil fraksi kloroform biji sirsak dengan nilai  $LC_{50}$  2,4667 ppm yang telah dilakukan oleh Nasliyana (2013).

Berdasarkan nilai  $LC_{50}$  ekstrak n-heksana dan kloroform yang menunjukkan nilai  $< 1000$  ppm, maka kedua ekstrak tersebut termasuk dalam kategori toksik atau memiliki bioaktivitas terhadap larva udang *A. salina*. Sehingga dapat dilakukan pengujian bioaktivitas lebih lanjut mengenai potensinya sebagai senyawa obat.

#### 4.5 Uji Fitokimia Komponen Aktif dengan Uji Reagen

Uji fitokimia dengan uji reagen dilakukan terhadap ekstrak kulit dahan sirsak yang memiliki bioaktivitas optimal (nilai  $LC_{50}$  kecil) terhadap larva udang *Artemia salina* L. Berdasarkan pengujian tersebut, ekstrak n-heksana dan kloroform kulit dahan sirsak merupakan ekstrak yang memiliki bioaktivitas optimal (nilai  $LC_{50}$  kecil). Uji yang dilakukan meliputi uji golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan triterpenoid/ steroid.

Uji fitokimia dilakukan untuk menunjukkan kandungan metabolit sekunder yang terekstrak dari sampel secara kualitatif dan mengetahui efektivitas pelarut dalam mengekstrak senyawa aktif. Efektivitas pelarut dapat dilihat dari intensitas warna. Intensitas warna yang lebih pekat menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mempunyai kadar metabolit sekunder yang lebih tinggi. Kandungan golongan senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak n-heksana dan kloroform kulit dahan sirsak dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Hasil pengamatan uji fitokimia

Golongan Senyawa	Ekstrak N-heksana	Ekstrak Kloroform
Alkaloid	-	-
Flavonoid	-	-
Tanin	-	-
Saponin	-	-
Triterpenoid	+	++
Steroid	-	-

Keterangan:

Tanda ++ : terkandung senyawa lebih banyak/warna pekat

Tanda + : terkandung senyawa/warna muda

Tanda - : tidak terkandung senyawa/tidak terbentuk warna

Ekstrak n-heksana dan kloroform kulit dahan sirsak memiliki kesamaan ekstrak teraktif yang ditunjukkan dengan nilai  $LC_{50}$  masing-masing 8,04317 ppm dan 3,38121 ppm. Dengan nilai  $LC_{50}$  yang cukup rendah tersebut maka kedua ekstrak tersebut termasuk ke dalam kategori sangat toksik. Adapun tingkat toksisitasnya menunjukkan ekstrak kloroform lebih tinggi daripada ekstrak n-heksana. Hasil uji ini berkorelasi dengan hasil uji fitokimia pada ekstrak n-heksana dan kloroform yang menunjukkan indikasi adanya kandungan triterpenoid. Akan tetapi memiliki intensitas yang berbeda antara ekstrak n-heksana dan kloroform. Ekstrak kloroform mempunyai kadar triterpenoid yang lebih tinggi daripada ekstrak n-heksana. Hal tersebut ditunjukkan dengan intensitas warna yang lebih pekat pada ekstrak kloroform.

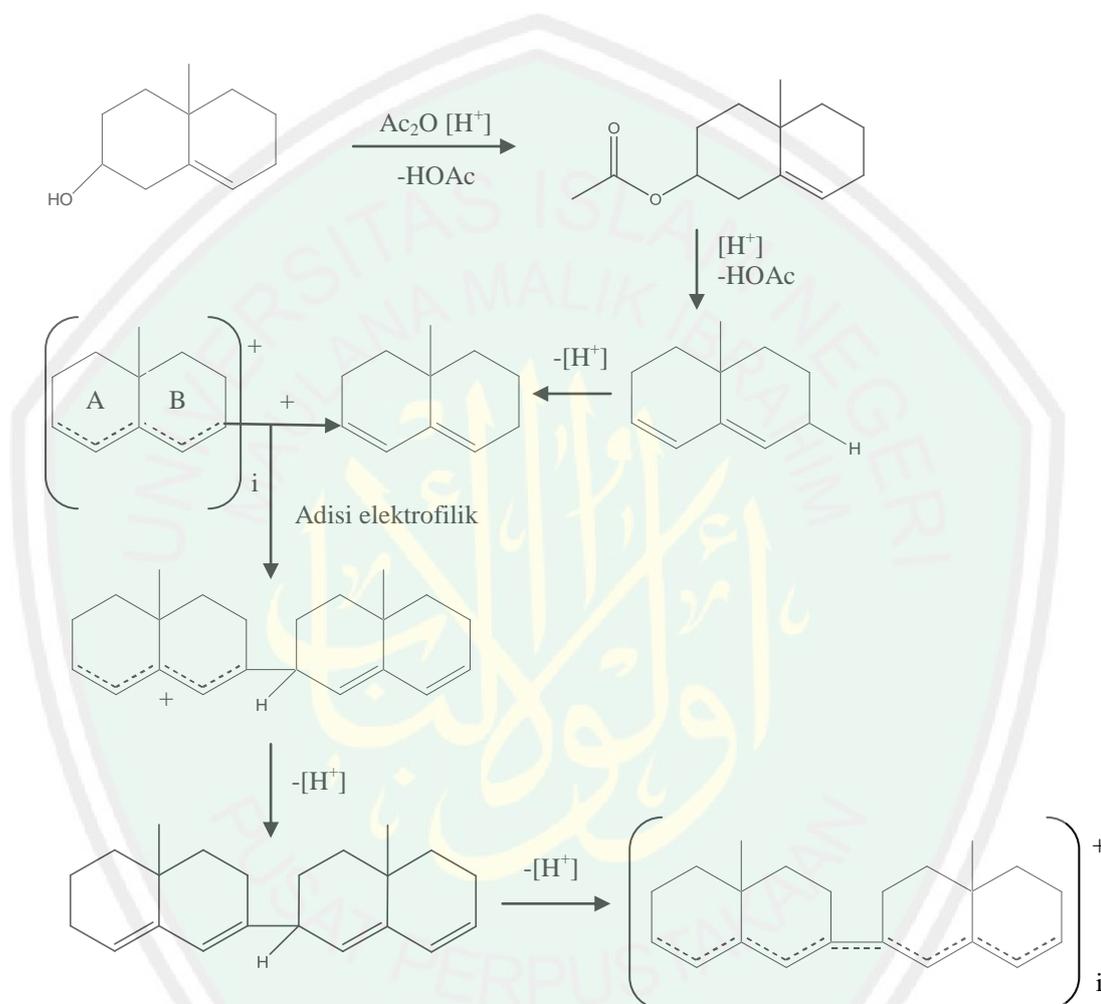
Triterpenoid tersusun dari rantai panjang hidrokarbon  $C_{30}$  yang menyebabkan sifatnya nonpolar sehingga mudah terekstrak dalam pelarut yang bersifat nonpolar seperti n-heksana. Ada beberapa senyawaan triterpenoid berstruktur siklik yang berupa alkohol, aldehyd atau asam karboksilat (Harborne, 1987). Senyawaan yang berstruktur alkohol yang memiliki gugus  $-OH$  menyebabkan sifatnya menjadi semipolar, sehingga dapat terekstrak dalam pelarut semipolar seperti kloroform.

Uji yang digunakan untuk mengidentifikasi adanya golongan senyawa triterpenoid/ steroid pada ekstrak n-heksana dan kloroform kulit dahan sirsak yaitu menggunakan reaksi Liebermann-Burchard (asam asetat anhidrat –  $H_2SO_4$  pekat). Uji pada penelitian ini dilakukan dengan cara mula-mula ekstrak dilarutkan dengan kloroform. Penambahan kloroform dilakukan untuk melarutkan

senyawaan ini karena larut baik dalam kloroform dan tidak mengandung air. Asam asetat anhidrat dalam reagen Lieberman-Burchard digunakan untuk membentuk turunan asetil setelah di dalam kloroform. Triterpenoid memberikan reaksi terbentuknya cincin kecoklatan ketika senyawa ini ditetesi asam sulfat pekat melalui dindingnya, sedangkan steroid akan menghasilkan warna hijau kebiruan (Robinson, 1995). Steroid akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan menghasilkan produk oksidasi yang memberikan reaksi warna biru sampai hijau. Sedangkan pada triterpenoid indikasi positif ditandai dengan cincin kecoklatan. Reaksi pembentukan warna ini dapat terjadi karena adanya gugus kromofor (gugus tak jenuh) yang disebabkan oleh absorpsi panjang gelombang tertentu oleh senyawa organik.

Prinsip reaksi dalam mekanisme reaksi uji terpenoid yang digambarkan pada Gambar 4.4 adalah kondensasi atau pelepasan  $H_2O$  dan penggabungan dengan karbokation. Reaksi ini diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan asam asetat anhidrat. Gugus asetil yang merupakan gugus pergi yang baik akan lepas, sehingga terbentuk ikatan rangkap. Selanjutnya terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya, mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa ini mengalami resonansi yang bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik, diikuti pelepasan hidrogen. Kemudian gugus hidrogen beserta elektronnya dilepas, akibatnya senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan munculnya warna pada sampel yang diuji (Siadi, 2012). Dugaan reaksi

terbentuknya warna pada uji terpenoid dengan reagen Liebermann-Burchard ditunjukkan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Dugaan reaksi terbentuknya warna pada uji terpenoid dengan reagen Liebermann-Burchard (Siadi, 2012)

Hasil uji fitokimia ekstrak n-heksana dan kloroform kulit dahan sirsak pada penelitian ini menunjukkan terbentuknya cincin kecoklatan yang menandakan bahwa ekstrak mengandung triterpenoid. Sedangkan untuk uji steroid tidak menunjukkan hijau kebiruan sehingga tidak menandakan adanya steroid. Hasil uji fitokimia tersebut memiliki kesamaan dengan hasil yang diperoleh dari

uji fitokimia fraksi n-heksana dan kloroform biji sirsak yang dilakukan oleh Nasliyana (2013) yang menunjukkan cincin kecoklatan pada sampel biji sirsak yang diuji.

Adanya golongan senyawa triterpenoid pada ekstrak n-heksana dan kloroform kemungkinan dapat dihubungkan secara kemotaksonomi dengan keberadaan senyawa yang memiliki bioaktivitas yang terdapat pada tanaman satu familia dengan sirsak yaitu *Xylopiya malayana* Hook. f.et Thomson. Senyawa aktif dalam kulit batang tanaman tersebut salah satunya adalah triterpenoid yang memiliki bioaktivitas sebagai antioksidan (Rahmawati, *et. al.*, 2013). Hasil penelitian Rahayu, *et. al.* (1993) juga menunjukkan bahwa dalam kulit batang srikaya (*Annona squamosa* Linn) juga terdapat golongan senyawa triterpenoid, yang memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri.

Hasil uji toksisitas dan uji fitokimia yang memiliki korelasi pada penelitian ini menunjukkan bahwa kedua ekstrak n-heksana dan kloroform kulit dahan sirsak memiliki senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai senyawa obat. Akan tetapi hal tersebut masih membutuhkan pembuktian lebih lanjut sebagai senyawa obat.

#### **4.6 Identifikasi Komponen Aktif dengan KLT**

Analisis kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mendukung dan memperkuat hasil uji fitokimia dengan metode uji reagen. Karena berfungsi sebagai pendukung, maka identifikasi dengan KLT hanya dilakukan untuk golongan senyawa yang menunjukkan hasil positif pada uji

fitokimia yaitu golongan senyawa triterpenoid pada ekstrak kloroform kulit dahan sirsak.

Pelaksanaan identifikasi dengan KLT pada penelitian ini menggunakan plat silika G 60 F<sub>254</sub> (Merck) dengan menggunakan fase gerak terbaik untuk golongan senyawa triterpenoid pada ekstrak kloroform berdasarkan penelitian sebelumnya. Plat KLT ini dilengkapi dengan indikator fluoresensi pada sinar UV yang bergelombang pendek. Pengamatan plat di bawah lampu UV yang dipasang panjang gelombang emisi 366 nm untuk menampakkan komponen senyawanya sebagai noda yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi seragam (Gritter, *et. al.*, 1991).

KLT kualitatif ini digunakan 5 macam fase gerak untuk mencari fase gerak terbaik dari beberapa fase gerak yang baik dalam pemisahan golongan senyawa triterpenoid. Fase gerak yang baik adalah fase gerak yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak ditandai dengan munculnya noda. Noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan yang lainnya jelas (Harborne, 1987). Fase gerak yang dipilih untuk pengembang disesuaikan dengan sifat kelarutan senyawa yang dianalisis. Pada penelitian ini digunakan beberapa campuran pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda untuk pemisahan golongan senyawa triterpenoid ekstrak kloroform.

Pelaksanaan identifikasi dengan KLT ini dimulai dengan melakukan aktivasi terhadap plat silika G 60 F<sub>254</sub>. Berdasarkan pernyataan Sastrohamidjojo (2007) bahwa Plat KLT silika G 60 F<sub>254</sub> diaktifasi dengan cara dioven pada suhu 100 °C selama 1 jam untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat KLT. Air

yang terdapat pada plat harus dihilangkan karena berdasarkan Gandjar dan Rohman (2007), adanya air dari atmosfer yang diserap oleh permukaan silika gel mampu mendeaktifkan silika gel dengan cara air menutup sisi aktif silika gel.

Proses selanjutnya dilakukan penotolan ekstrak sampel pada plat silika G 60 F<sub>254</sub>. Ekstrak yang telah ditotolkan pada plat selanjutnya dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawanya. Sebelum dilakukan elusi setiap campuran fase gerak dimasukkan dalam *great chamber* lalu ditutup rapat dan dilakukan penjenuhan selama 20–30 menit. Penjenuhan ini dilakukan untuk menyamakan tekanan uap pada seluruh bagian bejana. Selanjutnya plat dimasukkan dalam *great chamber* yang berisi fase gerak yang telah jenuh, diletakkan setinggi 0,5 cm dari dasar plat, kemudian *great chamber* ditutup rapat selama  $\pm 10$  menit hingga fase geraknya mencapai jarak  $\pm 0,5$  cm dari tepi atas plat. Proses tersebut merupakan proses pengembangan. Pengembangan adalah proses pemisahan cuplikan akibat pelarut mengembang naik dalam lapisan (Sastrohamidjojo, 2007). Kemudian plat diangkat dan dikeringkan dengan diangin-anginkan.

Noda yang dihasilkan selanjutnya diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm dan dideteksi dengan pereaksi yang sesuai dengan golongan senyawa triterpenoid. Pada penelitian ini digunakan pereaksi Lieberman-Burchard. Pereaksi ini digunakan untuk menambah kepekaan deteksi dan menghasilkan perubahan warna yang ada kaitannya dengan struktur golongan senyawa triterpenoid.

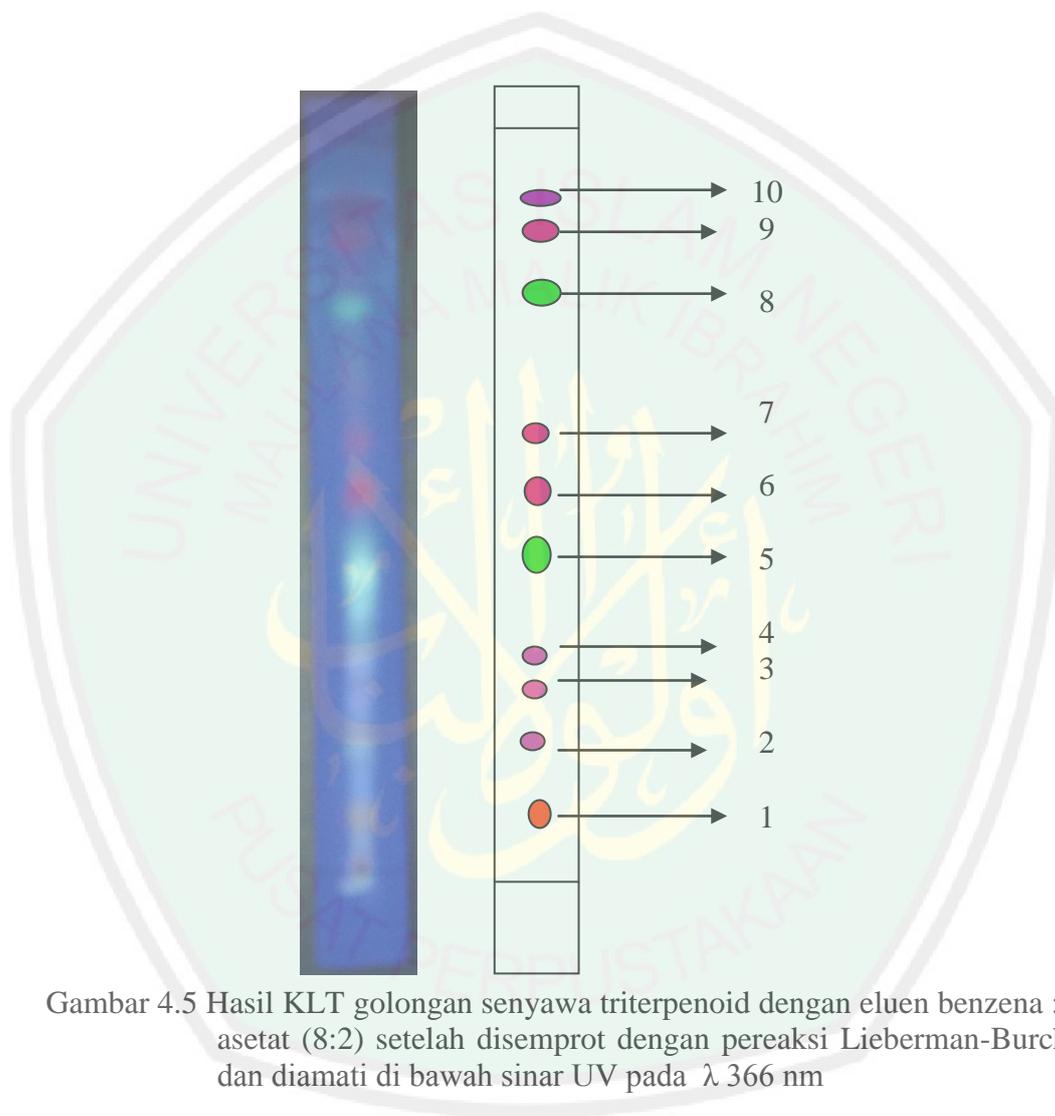
Hasil identifikasi golongan senyawa triterpenoid ekstrak kloroform dengan 5 macam fase gerak dengan campuran pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya, diantaranya adalah n-heksana : etil asetat (8:2), n-heksana : etil asetat (7:3), n-heksana : etil asetat (6:4), benzena : kloroform (3:7), dan benzena : etil asetat (8:2) dengan pereaksi Lieberman-Burchard dapat dilihat pada Lampiran 8. Data penampakan noda dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Data penampakan noda hasil KLT ekstrak kloroform kulit dahan sirsak berdasarkan 5 macam fase gerak setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard dan diamati di bawah sinar UV 366 nm

No	Variasi Komposisi Fase Gerak	Jumlah Noda	Nilai Rf	Keterangan
1	n-heksana : etil asetat (8:2)	5	0,04; 0,27; 0,40; 0,45; 0,53	Terpisah baik
2	n-heksana : etil asetat (7:3)	4	0,02; 0,09; 0,59; 0,66	Terpisah baik
3	n-heksana : etil asetat (6:4)	1	0,04	Tak terpisah
4	benzena : kloroform (3:7)	2	0,04; 0,05	Tak terpisah
5	benzena : etil asetat (8:2)	10	0,07; 0,16; 0,22; 0,27; 0,40; 0,51; 0,58; 0,75; 0,85; 0,89	Terpisah baik

Identifikasi dengan KLT ini digunakan 5 macam fase gerak dengan campuran pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya untuk ekstrak kloroform. Dari kelima fase gerak tersebut menunjukkan 1 fase gerak yang mampu memisahkan noda dengan baik. Pemisahan noda yang baik pada ekstrak kloroform ditunjukkan oleh profil KLT dengan fase gerak benzena : etil asetat (8:2). Hasil identifikasi golongan senyawa triterpenoid ekstrak kloroform dengan

eluen benzena : etil asetat (8:2) dengan pereaksi Lieberman-Burchard ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid dengan eluen benzena : etil asetat (8:2) setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard dan diamati di bawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm

Tabel 4.7 Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid dengan eluen benzena : etil asetat (8:2) setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard

No. Noda	Rf Noda	Warna Noda Tanpa Sinar UV $\lambda$ 366 nm	Warna Noda Dengan Sinar UV $\lambda$ 366 nm
1	0,07	Hijau	Oranye
2	0,16	Coklat	Ungu muda
3	0,22	Tak berwarna	Ungu muda
4	0,27	Tak berwarna	Ungu muda
5	0,40	Hijau	Hijau
6	0,51	Hijau	Merah keunguan
7	0,58	Tak berwarna	Merah keunguan
8	0,75	Kuning	Hijau
9	0,85	Hijau	Merah keunguan
10	0,89	Hijau	Ungu

Berdasarkan Gambar 4.5 menunjukkan pemisahan-pemisahan noda dengan nilai Rf yang berbeda-beda. Harga Rf merupakan ukuran kecepatan migrasi suatu komponen (solut) pada kromatogram. Nilai Rf dapat dihitung dengan membagi jarak titik tengah noda dari titik awal dengan jarak tempuh eluen dari titik awal. Kecepatan migrasi solut disebabkan oleh adanya perbedaan distribusi (D) oleh afinitas relatif solut (dalam hal ini campuran senyawa-senyawa golongan triterpenoid dari yang bersifat semipolar hingga nonpolar) pada fase diam (silika gel sebagai adsorben yang bersifat polar) dan fase gerak (bersifat nonpolar). Sebagaimana pernyataan Gandjar dan Rohman (2007) bahwa nilai D (perbandingan distribusi) didefinisikan sebagai perbandingan konsentrasi solut dalam fase diam ( $C_s$ ) dan dalam fase gerak ( $C_m$ ).

$$D = \frac{C_s}{C_m} \dots\dots\dots(IV.1)$$

Jadi semakin besar nilai  $D$  maka migrasi solut semakin lambat; dan semakin kecil nilai  $D$  maka migrasi solut semakin cepat. Solut akan terelusi menurut perbandingan distribusinya.

Hasil pemisahan KLT golongan senyawa triterpenoid ekstrak kloroform kulit dahan sirsak dengan eluen benzena : etil asetat (8:2) setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard dan diamati di bawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm menunjukkan 10 noda yang terpisah dengan baik yaitu dengan nilai  $R_f$  0,07; 0,16; 0,22; 0,27; 0,40; 0,51; 0,58; 0,75; 0,85; dan 0,89. Noda dengan nilai  $R_f$  lebih kecil (0,07; 0,16; 0,22; dan 0,27) menunjukkan adanya senyawa yang lebih polar. Karena lebih terdistribusi pada fase diam yang bersifat polar daripada fase geraknya, sehingga memiliki koefisien distribusi lebih besar. Sedangkan noda dengan nilai  $R_f$  lebih besar (0,40; 0,51; 0,58; 0,85; dan 0,89) menunjukkan adanya senyawa yang lebih nonpolar. Karena lebih terdistribusi pada fase gerak yang bersifat nonpolar daripada fase diamnya, sehingga memiliki koefisien distribusi lebih kecil. Campuran senyawa-senyawa tersebut akan bergerak secara kontinu diantara dua fase sesuai dengan koefisien distribusinya, sehingga akan diperoleh noda-noda yang terpisah dengan baik.

Golongan senyawa triterpenoid apabila dideteksi dengan reagen Lieberman-Burchard dan diamati di bawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm akan menunjukkan warna merah hingga ungu (Harborne, 1987). Berdasarkan Tabel 4.7 menunjukkan 7 noda yang diasumsikan sebagai golongan senyawa triterpeoid diantaranya noda berwarna ungu muda ( $R_f$  0,16; 0,22; dan 0,27); merah keunguan ( $R_f$  0,51; 0,58; dan 0,85); dan ungu ( $R_f$  0,89) setelah disemprot dengan pereaksi

Lieberman-Burchard dan diamati di bawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm. Hasil tersebut sesuai dengan hasil KLT yang dilakukan oleh Aliyan (2012) yang mengidentifikasi golongan senyawa triterpenoid pada fraksi petroleum eter biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King) menggunakan eluen benzena : etil asetat (8:2) dengan pereaksi Lieberman-Burchard dan diamati di bawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm menunjukkan noda berwarna ungu kehitaman dengan nilai Rf 0,21.

Pengamatan noda pada penelitian ini dilakukan di bawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm karena pada  $\lambda$  366 nm noda akan berfluoresensi sedangkan plat KLT tidak berfluoresensi pada  $\lambda$  366 nm sehingga akan tampak gelap. Fluoresensi merupakan cahaya yang dipancarkan dari suatu benda setelah benda itu terlebih dahulu dikenai penyinaran dari sumber cahaya. Warna yang tampak pada noda disebabkan karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh aoksokrom yang terdapat pada noda tersebut.

#### **4.7 Pemanfaatan Tumbuhan dalam Perspektif Islam**

Allah SWT memuliakan manusia dengan menambah pemberian-Nya berupa ilmu pengetahuan yang sangat diperlukan oleh manusia agar dapat menjadi *khalifah* yang baik di muka bumi ini. Tanpa ilmu pengetahuan manusia tidak ada artinya hidup di muka bumi ini, karena ilmu pengetahuanlah yang mengantarkan manusia kepada kehidupan yang lebih baik (Wardhana, 2004).

Sebenarnya sejak wahyu pertama diturunkan kepada Nabi Muhammad SAW, dengan perantaraan malaikat Jibril, Allah SWT telah mengisyaratkan agar

manusia mau belajar menguasai ilmu pengetahuan. Perintah Tuhan ini tersirat dalam firman-Nya yang berbunyi:

أَقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ ﴿١﴾ خَلَقَ الْإِنْسَانَ مِنْ عَلَقٍ ﴿٢﴾ أَلَمْ يَكُنْ الْأَكْرَمُ  
الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ ﴿٤﴾ عَلَّمَ الْإِنْسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ ﴿٥﴾

Artinya: “Bacalah dengan (menyebut) nama Tuhanmu yang telah menciptakan. Dia menciptakan manusia dari segumpal darah. Bacalah dan Tuhanmulah Yang Maha Pemurah. Yang mengajari manusia dengan perantaraan kalam. Dia mengajari manusia apa yang belum diketahuinya.” (QS. al ‘Alaq, 96: 1-5).

Tampak dari Surat al ‘Alaq ayat 1-5 tersebut di atas bahwa perintah membaca dan menulis adalah kunci untuk dapat menguasai ilmu pengetahuan. Yang harus dibaca adalah keadaan alam semesta yang diciptakan Allah SWT ini, yang banyak mengandung ilmu pengetahuan. Allah SWT sengaja menciptakan alam semesta ini agar dipelajari oleh manusia sebagai suatu ilmu pengetahuan (Wardhana, 2004).

Salah satu kekayaan di alam semesta ini yang harus dipelajari adalah tumbuhan. Allah SWT telah menciptakan bermacam-macam tumbuhan untuk makhluk-Nya. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat Thaahaa [20]: 53

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً  
فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّىٰ ﴿٥٣﴾

Artinya: “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan Yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” (QS. Thahaa: 53).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT yang menjadikan bumi bagi makhluk-Nya sebagai hamparan, tempat makhluk-Nya dibuai dan menetap, maka makhluk-Nya bangun, tidur, dan mengadakan perjalanan di atasnya. Allah SWT

menjadikan bagi makhluk-Nya di bumi itu jalan-jalan antara gunung dan lembah, tempat makhluk-Nya berjalan dan mengadakan perjalanan dari satu tempat ke tempat lain, untuk memenuhi kebutuhan dan memanfaatkan kekayaannya (Al Maraghi, 1993).

Allah SWT menurunkan air hujan dari langit, lalu dengan air hujan itu Allah SWT mengeluarkan berbagai jenis tumbuh-tumbuhan, seperti palawija dan buah-buahan, baik yang masam maupun yang manis. Juga mengeluarkannya dengan berbagai manfaat, warna, aroma, dan bentuk; sebagiannya cocok untuk manusia dan sebagian lainnya cocok untuk hewan. Di sini terdapat penjelasan tentang nikmat-nikmat Allah SWT yang dilimpahkan kepada makhluk-Nya melalui hujan yang melahirkan berbagai manfaat itu (Al Maraghi, 1993).

Al Quran merangsang manusia untuk selalu mau menggunakan akal (pikiran)nya dalam mencari jawaban atas penciptaan langit dan bumi. Usaha manusia untuk mencari jawaban yang dimaksud, merupakan awal mula timbulnya tradisi penelitian atau pengamatan terhadap alam sekitarnya yang pada akhirnya akan menjadi ilmu-ilmu yang sangat diperlukan oleh umat manusia. Allah SWT menciptakan langit dan bumi beserta segenap isinya tentulah tidak sia-sia, pasti ada maksud yang baik untuk manusia.

Sebagaimana penelitian yang telah dilakukan ini merupakan salah satu cara untuk bisa menguasai ilmu pengetahuan. Tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn) merupakan tumbuhan yang biasa dimanfaatkan buahnya untuk dimakan. Akan tetapi pada bagian lain dari tumbuhan tersebut bisa dimanfaatkan, misalnya biji, daun, kulit batang, dan akar sebagai insektisida, antitumor, atau antifungal.

Sebagaimana pada penelitian ini yang meneliti potensi bioaktivitas dari kulit dahan sirsak. Untuk mengetahui potensi tersebut maka dilakukan uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada ekstrak kloroform dan n-heksana kulit dahan sirsak menunjukkan nilai  $LC_{50}$  yang kecil ( $< 1000$  ppm) yaitu masing-masing 3,38121 ppm dan 8,04317 ppm; sehingga termasuk dalam kategori toksik. Dan dari hasil uji fitokimia dengan reagen dan identifikasi dengan KLT menunjukkan bahwa dalam ekstrak kloroform dan n-heksana kulit dahan sirsak terkandung golongan senyawa triterpenoid. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kulit dahan sirsak memiliki senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai senyawa obat. Akan tetapi hal tersebut masih membutuhkan pembuktian lebih lanjut, sehingga nantinya dapat dimanfaatkan sebagai obat.

Hasil penelitian tersebut merupakan suatu bukti bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang ada di langit dan di bumi tentulah ada maksud yang baik bagi manusia. Sehingga sebagai manusia harus memikirkan lebih jauh tentang isi al Quran demi untuk kepentingan manusia itu sendiri. Karena al Quran merupakan petunjuk bagi umat manusia yang membawa berita gembira berupa pemecahan masalah yang dihadapi manusia untuk keadaan masa lalu, keadaan saat ini maupun untuk pemecahan masalah pada masa yang akan datang. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat al Jaatsiyah ayat 13:

وَسَخَّرَ لَكُم مَّا فِي السَّمٰوٰتِ وَمَا فِي الْاَرْضِ جَمِيعًا مِّنْهُۥٓ اِنَّ فِيْ ذٰلِكَ لَاٰيٰتٍ لِّقَوْمٍ  
يَتَفَكَّرُوْنَ ﴿١٣﴾

*Artinya: “Dan Dia telah menundukkan untukmu apa yang di langit dan apa yang di bumi semuanya, (sebagai rahmat) daripada-Nya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang berfikir.” (QS. al Jaatsiyah: 13)*

Menggunakan tumbuhan sebagai obat merupakan salah satu cara memanfaatkan kekayaan yang ada di alam semesta yang telah diciptakan Allah SWT. Sebagaimana sabda Nabi Muhammad SAW yang memerintahkan agar berobat pada saat ditimpa penyakit. Karena Setiap penyakit itu pasti ada obatnya. Sebagaimana sabda Nabi Muhammad SAW berikut:

تَدَاوَوْا فَإِنَّ اللَّهَ لَمْ يَنْزِلْ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ مَعَهُ دَوَاءً غَيْرَ دَاءٍ وَاحِدٍ وَهُوَ الْهَرَمُ (رواه أبو داود و الترمذي عن أسامة بن شريك)

*Artinya : “Berobatlah, karena tiada satu penyakit yang diturunkan Allah, kecuali diturunkan pula obat penangkalnya, selain dari satu penyakit, yaitu ketuaan.” (HR. Abu Daud dan At-Tirmidzi dari sahabat Nabi, Usamah bin Syuraik)*

Manusia wajib untuk terus mencari dan mengembangkan segala macam bentuk ilmu pengetahuan demi kepentingan manusia itu sendiri. Tuhan tidak pernah membatasi jangkauan dan kemampuan manusia untuk mempelajari berbagai macam ilmu pengetahuan yang bermanfaat bagi manusia.

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

1. Ekstrak n-heksana dan kloroform kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn) memiliki bioaktivitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach, ditunjukkan dengan nilai  $LC_{50}$  yang kecil ( $< 1000$  ppm) yaitu 8,04317 ppm dan 3,38121 ppm; sehingga termasuk dalam kategori toksik. Sedangkan untuk ekstrak etanol tidak memiliki bioaktivitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach, ditunjukkan dengan nilai  $LC_{50}$  yang besar ( $> 1000$  ppm) yaitu 1205,71 ppm; sehingga termasuk dalam kategori tidak toksik.
2. Golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak n-heksana dan kloroform kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn) berdasarkan hasil uji fitokimia dengan uji reagen menggunakan reagen Liebermann-Burchard menunjukkan adanya golongan senyawa triterpenoid dengan terbentuknya cincin kecoklatan. Dan didukung dari hasil KLT dengan menggunakan eluen benzena : etil asetat (8:2) menunjukkan 7 noda yang diasumsikan sebagai golongan senyawa triterpenoid yaitu noda berwarna ungu muda ( $R_f$  0,16; 0,22; dan 0,27); merah keunguan ( $R_f$  0,51; 0,58; dan 0,85); dan ungu ( $R_f$  0,89) setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard dan diamati di bawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm.

## 5.2 Saran

1. Hasil uji pendahuluan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) menunjukkan dalam ekstrak n-heksana dan kloroform kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn) memiliki potensi bioaktivitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai  $LC_{50}$  kecil, sehingga perlu dilakukan pengujian *bioassay* lebih lanjut terhadap kulit dahan sirsak (*Annona muricata* Linn).
2. Hasil identifikasi dengan KLT menggunakan eluen benzena : etil asetat (8:2) menunjukkan 7 noda yang terpisah dengan baik, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi golongan senyawa triterpenoid yang terdapat dalam kulit dahan tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn) dan hasil isolasi golongan senyawa triterpenoid dapat dilakukan pengujian *bioassay* kembali.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S. A. 1986. *Buku Materi Pokok Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta : Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. 53-56.
- Adnan, M. 1997. *Teknik Kromatografi untuk Analisis Bahan Makanan*. Yogyakarta: Penerbit Andi.
- Aisyah, S. 2008. Analisa Konsentrasi Total Sapogenin Steroid dan Uji Sitotoksitas dari Fraksi Etil Asetat Biji Kelabet (*Trigonella foenum-graecum* L.) Terhadap Cell Line MCF-7 Secara Invitro. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif Hidayatullah.
- Aliyan, A. H. 2012. Uji Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Aktif Ekstrak Biji Mahoni (*Swietenia macrophylla* King). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Depok: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- Al Maraghi, A. M. 1993. *Terjemah Tafsir Al Maraghi*. Penj. Sitanggal, A. U., Aly, H. N., dan Abubakar, B. Semarang: Toha Putra Semarang.
- Ambara. 2007. Toksisitas Senyawa Kimia. <http://id.wordpress.com/ToksisitasSenyawaKimia/KimiaBiologi.htm> (diunduh pada tanggal 10 Maret 2013).
- Ambarwati. 2007. Efektivitas Zat Antibakteri Biji Mimba (*Azadirachta indica*) untuk Menghambat Pertumbuhan *Salmonella thyposa* dan *Staphylococcus aureus*. Surakarta: Prodi Kesehatan Masyarakat, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Surakarta. *Biodiversitas ISSN: 1412-033X*. Vol. 8, No. 3, Hal: 320-325.
- Anderson, J. E. dan McLaughlin, J. L. 1991. A blind comparison of simple bench top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumour pre-screens. *Phytocheml Anal* 2:107-111.
- Anonim. 2013. Klasifikasi Tumbuhan Sirsak. <http://www.plantamor.com/index.php?plant=106> (diunduh pada tanggal 15 Maret 2013).
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1984. *Official Methods of Analysis*. Ed ke-14. Arlington: AOAC.
- Arief. 2011. Budidaya Artemia. <http://arieffish.blogspot.com/> (diunduh pada tanggal 15 Maret 2013).

- Arifin, H., Anggraini, N., Dian, H. dan Rasyid, R. 2006. Standarisasi Ekstrak Etanol Daun *Eugenia cumini* Merr. *Jurnal*. Jakarta: Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Andalas.
- Asriyanti. 2011. Uji Aktivitas Dan Identifikasi Awal Ekstrak Aktif Daun Kemangi Hutan (*Ocimum* sp) Sebagai Penolak Nyamuk (*Culex* sp). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Ault, A. 1976. *Techniques and Experiments for Organic Chemistry*. Boston: Holbrook Press Inc.
- Balsamah, R.S. 2006. Optimalisasi Kondisi Ekstraksi Kurkuminoid Temulawak: Waktu, Suhu, dan Nisbah. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Bernasconi, G. 1995. *Teknologi Kimia 2*. Penj. Handoyo L. Jakarta: PT Prandya Paramitha.
- Cahyono, A. B. 2004. *Keselamatan Kerja Bahan Kimia di Industri*. Yogyakarta: UGM Press.
- Cannell, R. J.P. (Ed). 1998. How to approach the isolation of a natural product. In R.J. P. Cannell (Ed.). *Methods in Biotechnology*. Vol. 4: Natural Products Isolation, Humana, Totowa, NJ, pp. 1–51.
- Cheong, W. J. 2005. Determination Of Catechin Compounds In Korea Green Tea Infusions Under Various Extraction Conditions By High Performance Liquid Chromatography. *Department of Chemistry and Institute of Basic Research, Inha University, Bull. Korea chem. Sec.*, vol. 26, no. 5.
- Christie, W. W. 1982. *Extraction and Hydrolysis of Lipids and Some Reaction of Their Fatty Acid Component*. Di dalam H. K. Mangold, G. Zweig, dan J. Sherma, editor. *Hand Book of Chromatography Lipids*. Vol. 1. Boca Raton-Florida: CRC Press. Inc.
- Ciulei, J. 1984. *Metodologi for Analisis of Vegetables and Drugs*. Faculty of Pharmacy. Bucharest Rumania. 11–26.
- Colegate, S. M. dan Molyneux, R. J. 2007. *Bioactive Natural Products: Determination, Isolation and Structural Determination Second Edition*. Prancis: CRC Press.
- Copriady, J., Miharty dan Herdini. 2001. Gallokatekin: Senyawa Flavonoid Lainnya dari Kulit Batang Rengas (*Gluta rengas* Linn). *Jurnal Nature Indonesia*.

- Dwiatmaka, Y. 2001. Identifikasi Simplek dan Toksisitas Akut Secara BSLT Ekstrak Kulit Batang Pule (*Alstonia scholaris*). Yogyakarta: Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada.
- Emslie, S. 2013. *Artemia salina* – Brine Shrimp – Ses Monkeys. <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Artemiasaalina.html>. (diunduh pada tanggal 15 Maret 2013).
- Finney, D. J. 1971. *Probit Analysis. Ed Ke-2*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Fitriyani, A., Winarti, L., Muslichah, S. dan Nuri. 2011. Uji Antiinflamasi Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) Pada Tikus Putih. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember. *Majalah Obat Tradisional* 16(1) 34-42.
- Gandjar, I. B. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gritter, R. J., J. M. Robbit dan S. E. Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi Edisi Kedua*. Penj. Kokasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Guenther, E. 1987. *The Essential Oil*. 1972. Penj. S. Ketaren. Jakarta: UI Press.
- Hakim, E. H., Achmad, S. A., Makmur, L., Mujahidin, D., and Syah, Y. M. 2001. *Bull. Indo. Soc. Nat. Prod. Chem.*, 1: 1-10.
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hamburger M dan Hostettmann K. 1991. Bioactivity in Plant: The Link between Phytochemistry and Medicine. *Phytochemistry* 12: 3864-3847.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penj. Padmawinata, K. dan Soediro, I. Bandung: Penerbit ITB.
- Harjadi, W. 1993. *Ilmu Kimia Analitik Dasar*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Heath, J. B. dan Reinessius, G. 1987. *Flavor Chemistry and Technology*. New York: Van Nostrand Reinhold Co.
- Hendana, W. 2012. Toksisitas Akut Ekstrak Daun Sirsak Ratu (*Annona muricata*) dan Sirsak Hutan (*Annona glabra*) Sebagai Potensi Antikanker. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor: Departemen Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

- Hertiani, T. dan Pratiwi, S. U. T. 2002. Uji Toksisitas Kulit Batang Makutadewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.)Boerl.) Terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Aktif. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. *Majalah Farmasi Indonesia*, 13(2),65-70.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia, Jilid 2*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan.
- Hostetmann, K., J. L. Wolfender, dan Z. Srodrigue. 1997. Rapid Detection and Subsequent Isolation of Bioactive Constituents of Crude Plant Extracts. *Planta Med.* 63: 2-10.
- Houghton P. J. dan Raman A. 1998. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Chapman Hall. London: United Kingdom.
- Ikhtimami, A. 2012. Pengaruh Periode Subkultur Terhadap Kadar Saponin Akar Rambut Tanaman Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Surabaya: Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Airlangga.
- Inayah, F. 2011. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Dari Ekstrak Metanol Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Indrayani, L., H. Soetjipto dan L. Sihasale. 2006. Skrinning Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. Salatiga: Fakultas Sains dan Matematika Universitas Kristen Satya Wacana. *Berk. Penel. Hayati: 12* (57-61).
- Iskandar, Y., Marliani, L. dan Irawan, J. F. 2012. Toksisitas Ekstrak Etanol dan Fraksi-Fraksi Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Menggunakan BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). *Skripsi Penelitian*. Bandung: Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.
- Kassahara, S. dan Hemmi. 1986. *Medicinal Herb Index in Indonesia, Ed Ke-2*. Jakarta: Penerbit PT. Eisai.
- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI-Press.
- Krisyuninda, M. P. 2012. Uji Toksisitas Fraksi *Spons Callyspongia* sp. dengan Metode Brine Shrimp Test (BST) dari Perairan Pasir Putih Situbondo. *Jurnal*. Surabaya: Program Studi Biologi FMIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

- Lehninger, H. H. dan Baverloo, W. A. 1976. *Food Process Engineering*. Boston: D Reidel Pulb Co.
- Lenny, S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida*. Medan: MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Lenny, S. 2006. *Uji Bioaktifitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Brine Shrimp*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Loomis T. A. 1978. *Toksikologi Dasar. Ed ke-3*. Semarang: IKIP Semarang.
- Lusiana, H. 2009. Isolasi Dan Uji Anti Plasmodium Secara In Vitro Senyawa Alkaloid dari *Albertisia papuana* BECC. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Mahmiah. 2006. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Kulit Batang Tumbuhan *Saccopetalum horsfieldii* Benn. Surabaya: Universitas Hang Tuah. *Jurnal Kimia* 6 (3), 312 – 315.
- Manan, J. dan Mubasyir, A. A. 2006. *Membuat Reagen Kimia di Laboratorium*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Mansyur. 2002. *Toxicology Predictive Toxicology Membran-Cell*. USU Digital Library. Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara.
- Markham, K. R. 1998. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: ITB.
- Marliana, S. D., Suryanti, V. dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. Surakarta: Jurusan Biologi FMIPA UNS. *Jurnal Biofarmasi* 3 (1): 26-31 ISSN: 1693-2242.
- McLaughlin J. L, Rogers L. L., and Anderson J. E. 1998. The use of biological assay to evaluate botanocals. *J Drugs Inform.* 32 (1): 13-517.
- McLaughlin, J. L. 1991. Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination. *Methods in Plants Biochemistry.* 6 (1): 1-30.
- Meloan, C. E. 1999. *Chemical Separations : Principles, Techniques, and Experiments*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Meyer B. N., Ferigni N. R., Putnam J. E., Ja Cobsen L. B., Nichols D. E. and McLaughlin J. L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. *Planta Medica*.

- Mudjiman. 1989. *Udang Renik Air Asin (Artemia salina)*. Jakarta: Bhatara.
- Mulyawati, P. A. 2010. Uji Efektivitas dan Identifikasi Senyawa Ekstrak Biji Sirsak (*Annona muricata* Linn.) yang Bersifat Bioaktif Insektisida Nabati Terhadap Hama *Thrips*. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Nasliyana, S. 2013. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Biji Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Nazmi, M. 2013. Pencirian Ekstrak Aktif Sitotoksik dari Daun Sirsak Gundul (*Annona glabra*) Indonesia. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor: Departemen Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Nur, M. A. dan Adijuwana, H. A. 1989. *Teknik Spektroskopi dalam Analisis Biologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati Institut Pertanian Bogor.
- Oberlies. 2003. Cytotoxic Annonaceous Acetogenins From *Annona muricata*. <http://www.freepatentsonline.com20030144348.html> (diunduh pada tanggal 15 Maret 2013).
- Octavia, D. R. 2009. Uji Aktivitas Penangkap Radikal Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat dan Etanol Daun Binahong (*Anredera corfolia* (Tenore) Steen) dengan metode DPPH (2,2-difenil-1- pikrihidrasil.). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah.
- Opinion. 2013. *Artemia*, Pakan Alami Berkualitas untuk Ikan dan Udang. <http://www.opinion.com/> (diunduh pada tanggal 15 Maret 2013).
- Padua, L. S. N., Bunyaphatsana, R. H., dan Lemmens, M. J. (eds.). 1999. *Medicinal and Poisonous Plant Research of South-East Asia 12. Pudoc Scientific Publisher*. Wageningen, the Netherland. p.353-359.
- Paimin, F. R. 2001. *Zuurzak, Sikantong Asam*. Jakarta: Trubus 397-Juni 2001/XXII.
- Pisutthanan, S., Plianbangchang, P., Pisutthanan, N., Ruanruay, S., dan Muanrit O. 2004. Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in The Family Meliaceae. *Naresuan University Journal*. 12(2): 13-8.

- Poedjiadi, A. dan F. M. T. Supriyanti. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Pomeranz, Y. dan Meloan, C. E. 1980. *Food Analysis*. AVI Book Publ. Inc., Westport, Connecticut.
- Putri, I. P. 2013. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Bunga Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Rachmawati, E., Karyono, S., dan Suyuti, H. 2012. Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak pada Proliferasi dan Apoptosis Sel HeLa yang Dimediasi oleh p53. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol. 27. No. 1.
- Rahayu, R. D., Chairul, dan Harapini, M. 1993. Penelitian Fitokimia dan Efek Anti Mikrobial Ekstrak Srikaya Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli*. *Pros. Seminar Hasil Litbang SDH*. LIPI.
- Rahmawan, A. J. 2011. Bioaktivitas Ekstrak Etanol Suren Beureum (*Toona sinensis* Roemor) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Bogor: Departemen Hasil Hutan Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor.
- Rahmawati, S., Hendra, R., dan Yuharmen. 2013. Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksan dari Kulit Batang Tumbuhan *Xylopia malayana* Hook. f.et Thomson (*Annonaceae*). Riau: Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau.
- Reveny, J. 2011. Daya Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper betle* Linn.). Fakultas Farmasi Universitas Sumatra Utara. *Jurnal ILMU DASAR*. Vol. 12 No. 1: 6-12.
- Rita, W. S. 2010. Isolasi, Identifikasi, dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Golongan Triterpenoid pada Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe). Bukit Jimbaran: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana. *Jurnal Kimia 4 (1)*: 20-26.
- Rita, W. S., Suirta I. W., dan Sabikin A. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa yang Berpotensi Sebagai Antitumor pada Daging Buah Pare (*Momordica carantia* L.). Bukit Jimbaran: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana. *Jurnal Kimia 2(1)*. ISSN 1907-9850: 1-6.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Penj. Padmawinata, K. Bandung: ITB.

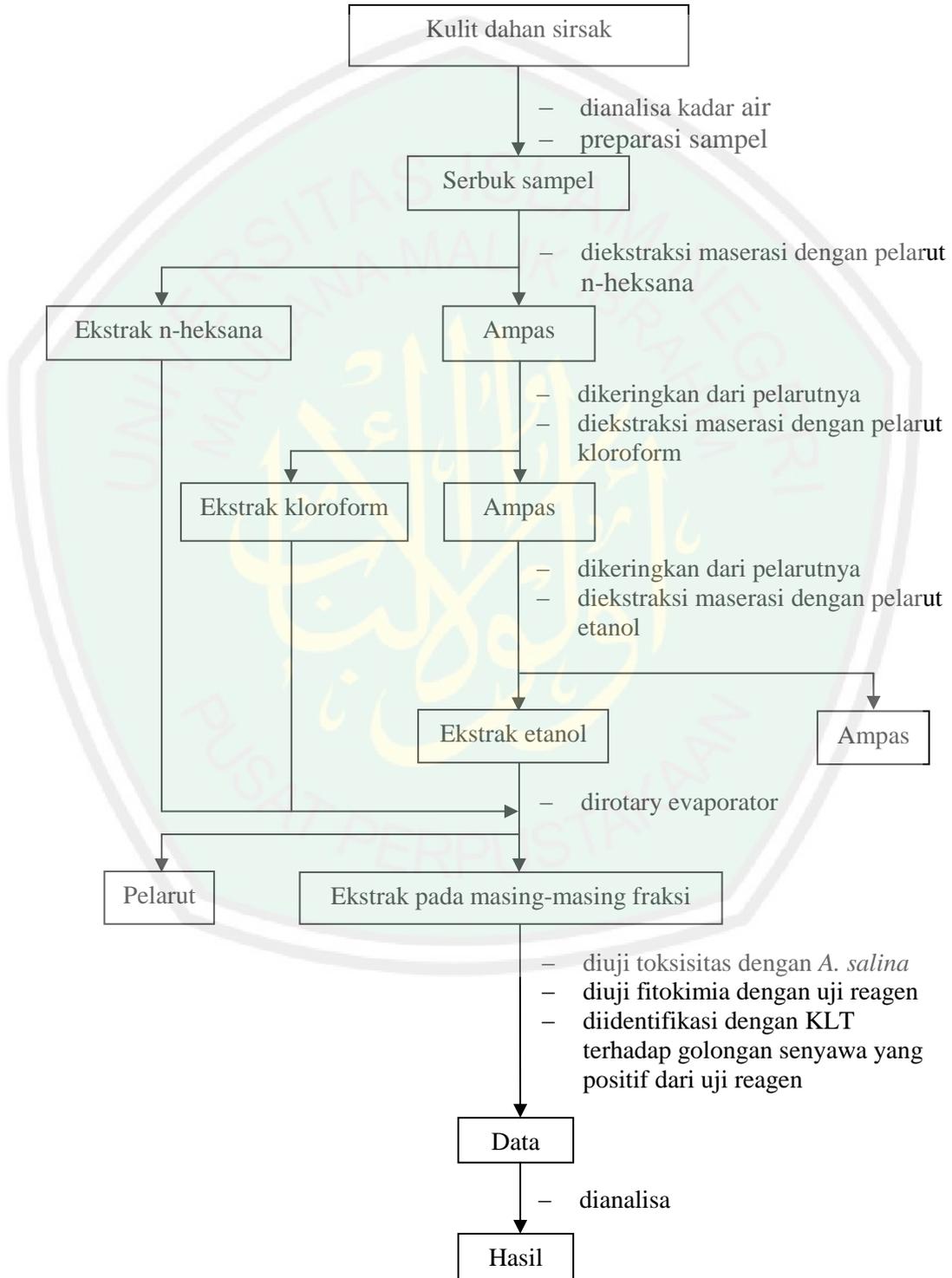
- Rossidy, I. 2008. *Fenomena Flora dan Fauna dalam Perspektif Al Quran*. Malang: UIN Malang Press.
- Sa'adah, L. 2010. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Tanin dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Sabel W. dan Warren, J. D. F. 1973. *Theory and Practise of Oleoresin Extraction*. London: Tropical Products Institute.
- Santi, S. R. 2011. Senyawa Antimakan Triterpenoid Aldehyd dalam Biji Sirsak (*Annona muricata* Linn). Bukit Jimbaran: FMIPA Universitas Udayana. *Jurnal Kimia* 5 (2), Juli 2011 : 163-168.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Setiaji, A. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat dan Etanol 70% Rhizoma Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 11229 Serta Skrining Fitokimianya. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Shiddiqi, T., Rindiasuti, Y., dan Sri, W. N. A. 2008. Potensi In Vitro Zat Sitotoksik Antikanker Daun Tanaman Kepel (*Stelechocarpus buharol*) Terhadap *Carcinoma Colorectal*. *Karya Tulis Ilmiah*. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Shihab, M. Q. 2007. *Wawasan Al Quran Tafsir Tematik atas Pelbagai Persoalan Umat*. Bandung: Mizan Pustaka.
- Siadi, K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) Sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. Semarang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Semarang. *Jurnal*. ISSN 0215-9945. 35 (1).
- Sinurat, I. V. 2011. Karakterisasi Simplisia, Skrining Fitokimia dan Uji Sitotoksitas Ekstrak Daun Tumbuhan Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Sriwahyuni, I. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan *Brine Shrimp* (*Artemia salina* Leach). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Stahl E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Penj. Padmawinata. Bandung: Institut Pertanian Bogor.
- Sudarmadji, S., B. Haryono dan Suhardi. 2003. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sulianti, S. B., Kuncari, E. S., dan Chairul, S. M. 2006. Pemeriksaan Farmakognosi dan Penapisan Fitokimia dari Daun dan Kulit Batang *Calophyllum inophyllum* dan *Calophyllum soulatri*. *Jurnal. Biodiversitas ISSN: 1412-033X. Vol. 7, No. 1, Hal.: 25-29*.
- Sunarni, Iskamto dan Suhartinah. 2003. Uji Toksisitas dan Anti Infeksi Ekstrak Etanol Buah *Brucea sumatrana* Roxb. terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dan *Staphylococcus aureus*. *BioSmart 5 (4): 65-67*.
- Suradikusumah, E. 1989. *Kimia Tumbuhan*. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Suyatmi, Suselo, Y. H., dan Jusuf, S. A. 2012. The Selective Cytotoxicity of Ethanolic Extract of *Annona muricata* Leaf on HeLa Cervical Cancer Cells. *International Conference: Research and Application on Traditional Complementary and Alternative Medicine in Health Care (TCAM)* Surakarta, Indonesia.
- Ulfa, M. 2007. Isolasi dan Bioaktivitas Senyawa Fenilpropanoid dari Ekstrak Kulit Batang *Kleinhovia hospita* L. Mataram: FMIPA Universitas Mataram. *Jurnal. Vol. 2. No. 2: 47-50*.
- Venkataraman, K. 1976. Recent Work on Some Natural Phenolic Pigments. *Phytochemistry*. p.p.1571-1586.
- Vickery M. L. and Vickery B. 1981. *Secondary Plant Metabolism*. London and Basing Stoke: The Mcmillan Press Ltd.
- Wagner, H. and Blatt, S. 2001. *Plant Drug Analysis; a Thin layer Chromatography Atlas*. Berlin: Springer.
- Wardhana, A. H., Widyastuti, E., Wiratmana, A. W. A., Muharsini, S. dan Darmono. 2004. Uji Efikasi Ekstrak Heksan Daging Biji Srikaya (*Annona squamosa* L) terhadap Pertumbuhan Larva Lalat *Chrysomya bezzina* secara In Vitro. Bogor: Balai Penelitian Veteriner. *JITV Vol. 9. No. 4 Th. 2004*.
- Wardhana, W. A. 2004. *Al Quran dan Energi Nuklir*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Widjanarko, S. 2008. Fitokimia Herba Konyal. <http://simonbwidjanarko.files.wordpress.com/2008/07/fitokimiaherbakonyal.pdf> (diunduh pada tanggal 10 Maret 2013).
- Widriyanti, Y. N., Budiarti, A. dan Syahida, I. A. 2010. Aktivitas Mikolitik In Vitro Ekstrak Etanol Daun Sirih merah (*Piper crocotum* Ruiz dan Pav.) pada Mukosa Usus Sapi dan identifikasi Kandungan Kimianya. *Jurnal*. Semarang: Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim.
- Widyastuti, T. E. dan F. B. Paimin. 1992. *Mengenal Buah Unggul Indonesia*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Winarno FG. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Wonohadi, E., Ayu, D., Agustin, D., Liasthirani, S. dan Melani. 2006. Identifikasi Senyawa Anti Mikroba Rimpang Temu Giring (*Curcuma heyneana* Val dan Van Zijp) secara Bioautografi. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitass Surabaya. *Jurnal Farmasi Indonesia Vol.3 No.2*: 89-96.
- Yuliani, S. dan Rusli, S. 2003. *Ekstraksi Pestisida Nabati*. Bogor: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat.
- Zahro, I. M. 2011. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid Ekstrak N-Heksana Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn.) Menggunakan Spektrofotometer UV-VIS dan FTIR. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Zebua, N.I. 2011. Aktivitas Hambatan Gabungan Ekstrak Kunyit (*Curcuma domestica* Va), Temulawak (*Curcuma xanthorriza* Roxb), dan Lempuyang (*Zingiber zerumbet*) Terhadap Poliferasi Sel Kanker Usus Besar HCT (ATCC-CCL 116). *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

LAMPIRAN

Lampiran I. Diagram Alir Penelitian



## Lampiran 2. Skema Kerja

### L.2.1 Analisis Kadar Air (AOAC, 1984)

Sampel Kulit Dahan Sirsak

- dipotong kecil-kecil
- dipanaskan cawan dalam oven pada suhu 100-105 °C selama 15 menit, disimpan dalam desikator selama 10 menit kemudian ditimbang, dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan
- dimasukkan sampel ke dalam cawan yang telah diketahui berat konstannya
- ditimbang sampel sebanyak 5 g
- dikeringkan di dalam oven pada suhu 100-105 °C selama ± 60 menit
- didinginkan dalam desikator selama ± 10 menit
- ditimbang
- dipanaskan kembali dalam oven ± 30 menit
- didinginkan dalam desikator
- ditimbang kembali
- diulangi perlakuan ini sampai diperoleh berat konstan
- dihitung kadar air menggunakan rumus berikut

$$\text{Kadar air} = \frac{(b - c)}{(b - a)} \times 100 \%$$

Keterangan:  $a$  = berat konstan cawan kosong

$b$  = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

$c$  = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

Hasil

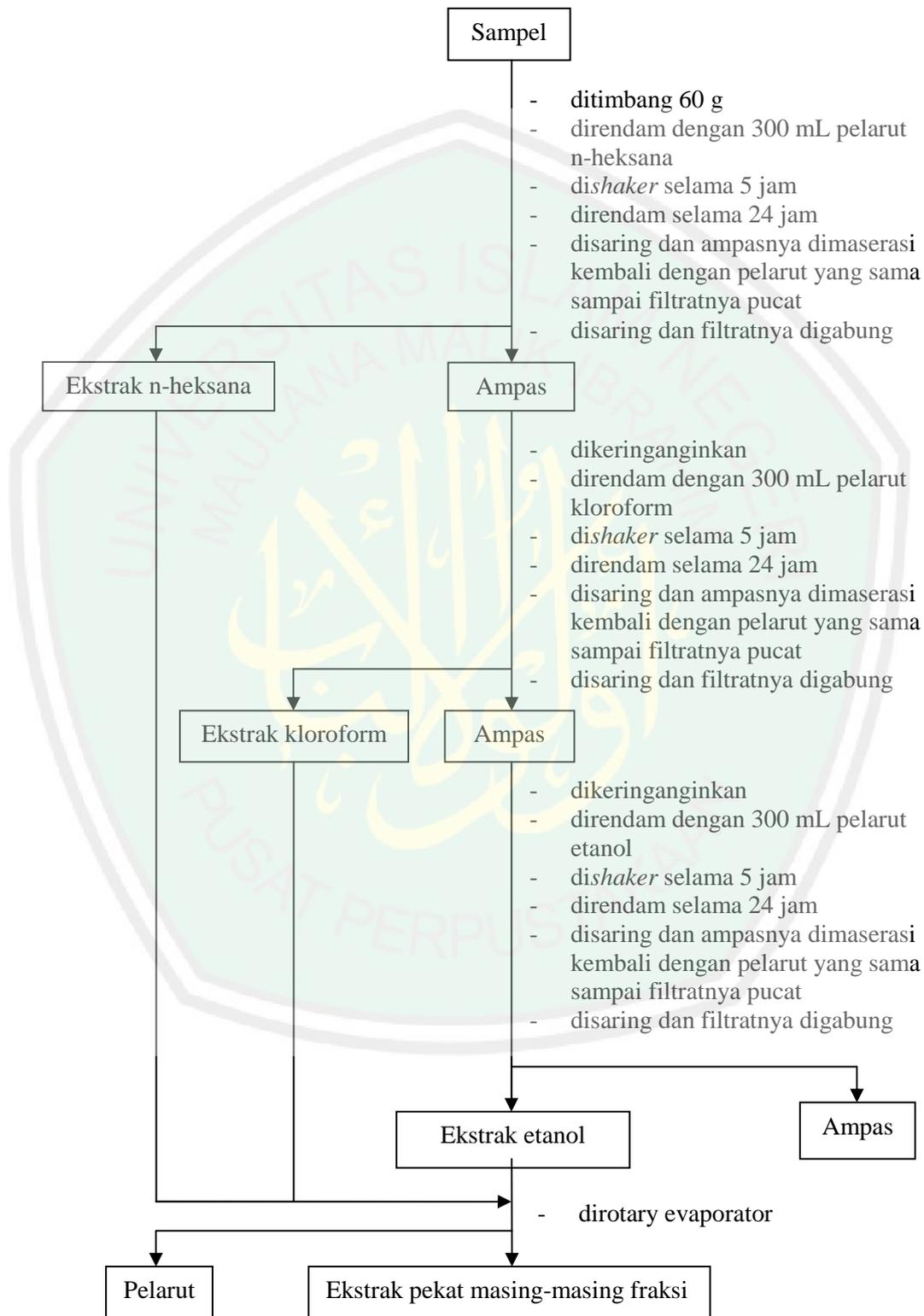
### L.2.2 Preparasi Sampel (Sulianti, *et. al.*, 2006; Rita, *et. al.*, 2008; Rahmawan, 2011; Ulfa, 2007)

Sampel

- diambil kulit dahan sirsak
- dibersihkan dari kotoran
- dipotong kecil-kecil
- dikeringanginkan selama 4 hari
- dihaluskan sampai berbentuk serbuk
- diayak dengan saringan berukuran 40-60 mesh
- dikeringkan kembali dalam oven pada suhu 40 °C selama 2 jam

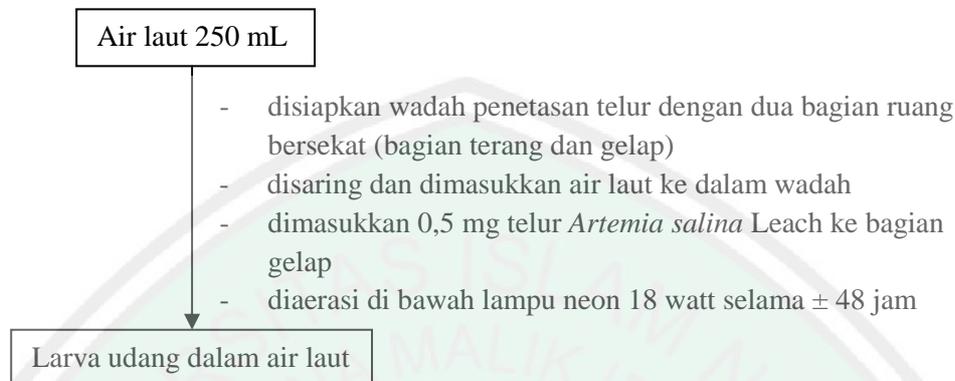
Hasil

### L.2.3 Ekstraksi Komponen Aktif (Halimah, 2010; Mulyawati, 2010)

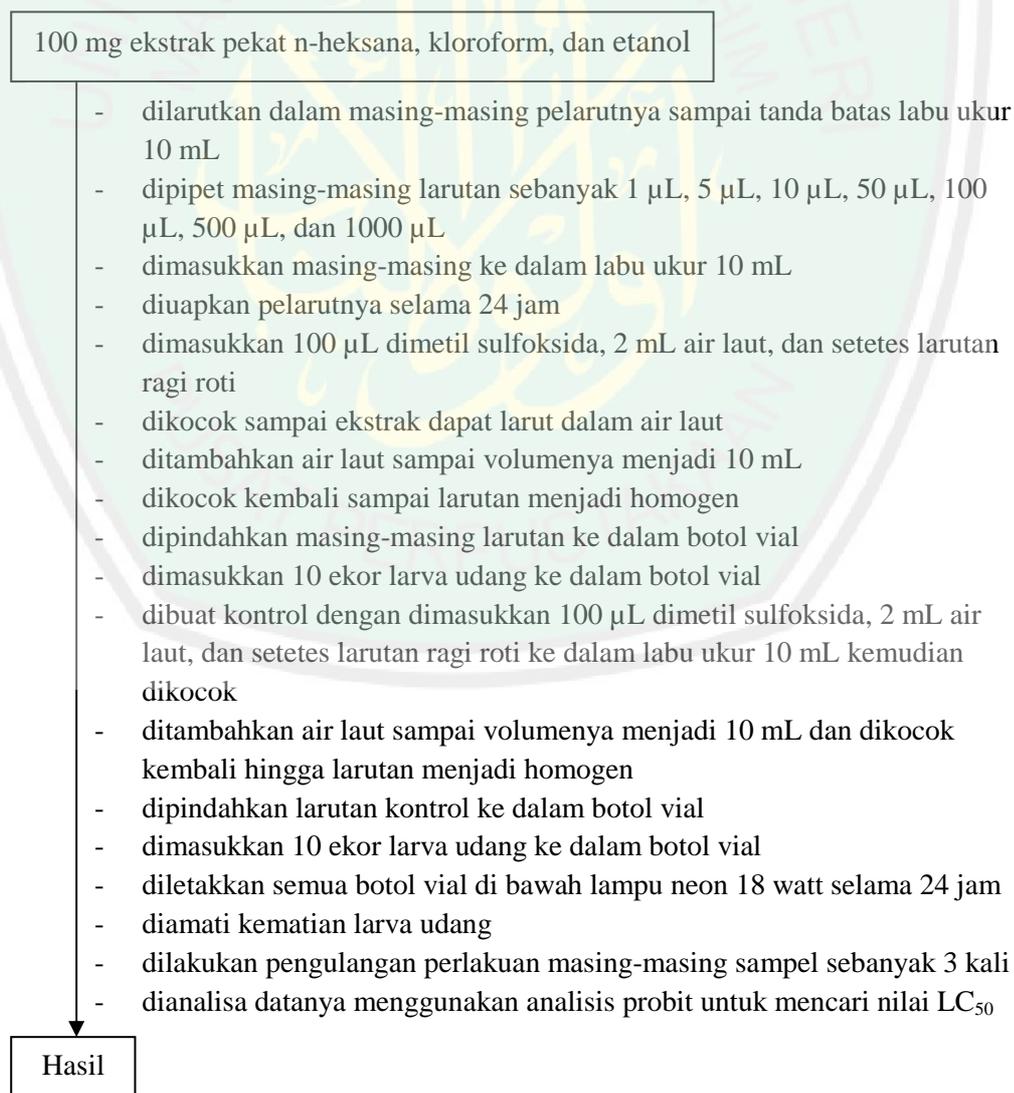


## L.2.4 Uji Toksisitas dengan Larva Udang *Artemia salina* Leach

### L.2.4.1 Penetasan Telur (Mc.Laughlin, 1991)



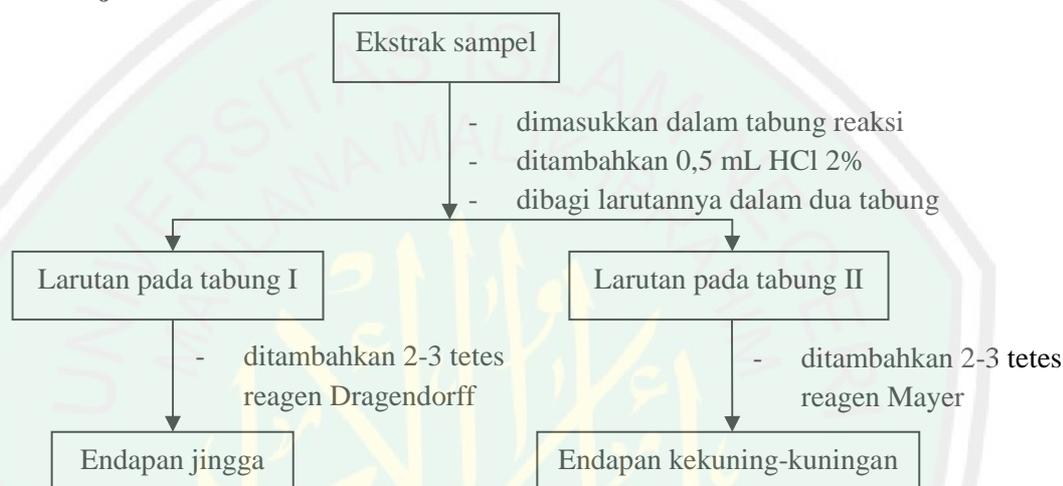
### L.2.4.2 Uji Toksisitas (Meyer *et. al.*, 1982)



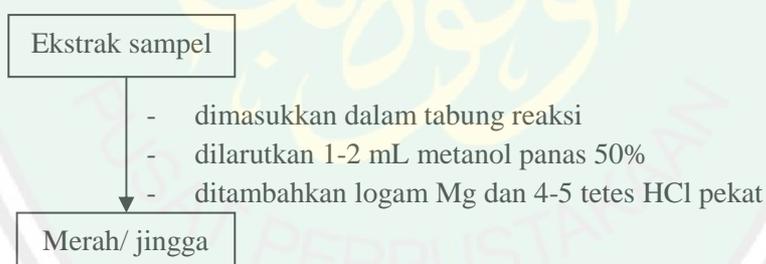
### L.2.5 Uji Fitokimia dengan Uji Reagen (Ciulei, 1984)

Uji fitokimia kandungan senyawa aktif dengan uji reagen dilakukan pada ekstrak yang memiliki bioaktivitas optimal (nilai  $LC_{50}$  kecil). Uji yang dilakukan meliputi uji golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan triterpenoid/ steroid.

#### L.2.5.1 Uji Alkaloid



#### L.2.5.2 Uji Flavonoid

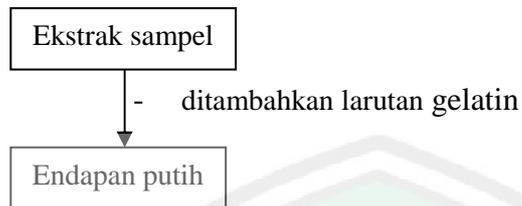


#### L.2.5.3 Uji Tanin

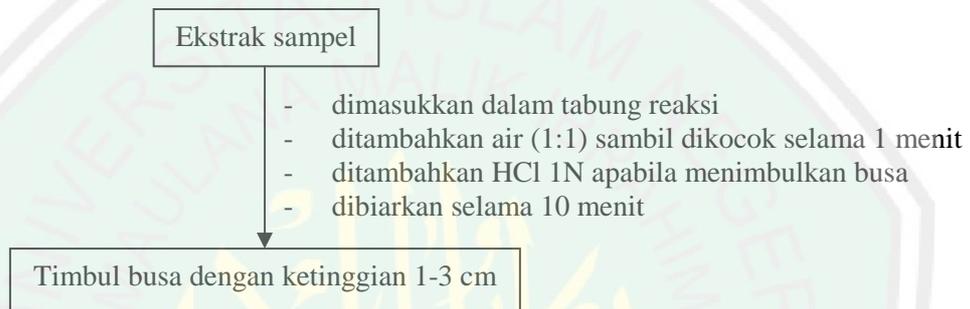
##### L.2.5.3.1 Uji dengan $FeCl_3$



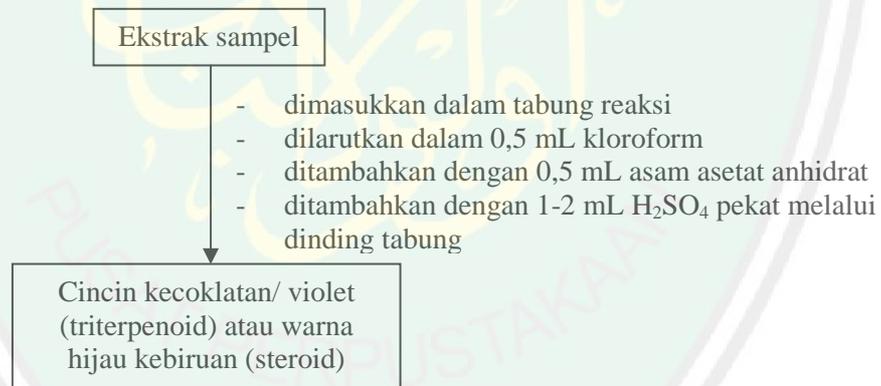
### L.2.5.3.2 Uji dengan Larutan Gelatin



### L.2.5.4 Uji Saponin

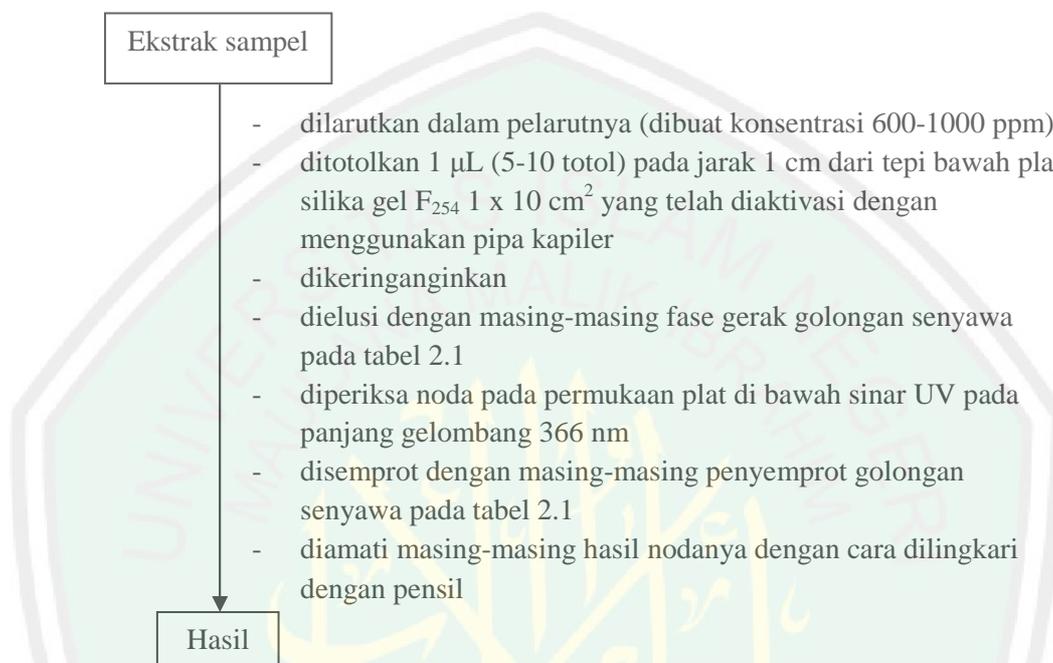


### L.2.5.5 Uji Triterpenoid/ Steroid



### L.2.6 Uji Fitokimia dengan KLT (Gandjar dan Rohman, 2007)

Uji fitokimia dengan KLT dilakukan terhadap golongan senyawa yang positif dari hasil uji fitokimia dengan uji reagen.



Tabel 2.1 Jenis-jenis fase gerak dan pendeteksi uji KLT untuk metabolit sekunder

Golongan Senyawa	Fase Gerak	Pereaksi	Hasil Warna Noda
Triterpenoid	N-heksana : Etil asetat (8:2)	Lieberman-Burchard	ungu merah
	N-heksana : Etil asetat (7:3)	Lieberman-Burchard	ungu, merah keunguan, dan merah muda
	N-heksana : Etil asetat (6:4)	Lieberman-Burchard	ungu merah
	Benzena : Kloroform (3:7)	Lieberman-Burchard	ungu tua, ungu muda, ungu dan merah keunguan
	Benzena : Etil asetat (8:2)	Lieberman-Burchard	ungu kehitaman

### Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Reagen dan Larutan

#### L.3.1 Pembuatan HCl 2 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$37 \% \times V_1 = 2 \% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah dipipet larutan HCl pekat 37 % sebanyak 0,5 mL kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

#### L.3.2 Pembuatan larutan HCl 1 N

$$\text{BJ HCl pekat} = 1,19 \text{ g/mL} = 1190 \text{ g/L}$$

$$\text{Konsentrasi} = 37 \%$$

$$\text{BM HCl} = 36,42 \text{ g/mol}$$

$$n = 1 \text{ (jumlah mol ion H}^+\text{)}$$

$$\text{Normalitas HCl} = n \times \text{Molaritas HCl}$$

$$= 1 \times \frac{37 \% \times \text{BJ HCl}}{\text{BM HCl pekat}}$$

$$= \frac{37 \% \times 1190 \text{ g/L}}{36,42 \text{ g/mol}} = 12,09 \text{ N}$$

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$12,09 \text{ N} \times V_1 = 1 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 8,27 \text{ mL} = 8,3 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan HCl pekat 37 % sebanyak 8,3 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### L.3.3 Pembuatan Reagen Dragendorff

Larutan I : Sebanyak 0,6 g bismut subnitrat  $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

Larutan II : Sebanyak 6 g KI dilarutkan dalam 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

Cara pembuatannya adalah kedua larutan dicampur dengan 7 mL HCl pekat dan 15 mL  $\text{H}_2\text{O}$  (Harbone, 1987). Pereaksi Dragendorff ini harus disimpan dalam botol yang berwarna gelap.

### L.3.4 Pembuatan Reagen Mayer

Larutan I :  $\text{HgCl}_2$  1,358 g dalam aquades 60 mL

Larutan II : KI 5 g dalam aquades 10 mL

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan  $\text{HgCl}_2$  1,358 g yang dilarutkan dengan aquades 60 mL dan larutan II dibuat dengan KI 5 g yang dilarutkan dengan aquades 10 mL. Larutan I dituangkan ke dalam larutan II, diencerkan dengan aquades sampai tanda batas pada labu ukur 100 mL (Manan dan Mubasyir, 2006).

### L.3.5 Pembuatan Larutan Metanol 50 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,99 \% \times V_1 = 50 \% \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

Cara pembuatan larutan metanol 50 % adalah dipipet larutan metanol pekat 99,99% sebanyak 5 mL. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL. Selanjutnya ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### L.3.6 Pembuatan FeCl<sub>3</sub> 1%

$$1\% = \frac{1 \text{ gram}}{\text{gram total}} \times 100\%$$

$$\text{Gram total} = \frac{1 \text{ g}}{1\%} \times 100\%$$

$$\text{Gram total} = \text{gram terlarut} + \text{gram pelarut}$$

$$\begin{aligned} \text{Gram pelarut} &= 100 \text{ gram} - 1 \text{ gram} \\ &= 99 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$\text{volume pelarut} = \frac{\text{g pelarut}}{\text{BJ pelarut}} = \frac{99 \text{ g}}{1 \text{ g/mL}} = 99 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah ditimbang serbuk FeCl<sub>3</sub> sebanyak 1 g kemudian dilarutkan dengan 99 mL aquades.

### L.3.7 Pembuatan Larutan Gelatin

Serbuk gelatin      2,5 g

NaCl jenuh          50 mL

Cara pembuatannya adalah 2,5 g serbuk gelatin dicampur dengan 50 mL larutan garam NaCl jenuh, kemudian dipanaskan sampai gelatin larut seluruhnya. Setelah dingin, ditambah larutan garam NaCl jenuh dalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen (Sudarmadji, *et. al.*, 2003).

### L.3.8 Pembuatan reagen Lieberman-Burchard

Asam sulfat pekat    5 mL

Anhidrida asetat    5 mL

Etanol absolut        50 mL

Cara pembuatannya adalah asam sulfat pekat 5 mL dan anhidrida asetat 5 mL dicampur ke dalam etanol absolut 50 mL, kemudian didinginkan dalam lemari

pendingin. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan (Wagner and Bladt, 2001).

### L.3.9 Perhitungan Konsentrasi Larutan Ekstrak untuk Uji Toksisitas

#### a. Pembuatan larutan stok 10000 ppm ekstrak kulit dahan sirsak

$$\text{ppm} = \text{mg/L}$$

$$\text{mg} = \text{ppm} \cdot \text{L} \text{ (jika dibuat larutan stok 10 mL = 0,01 L)}$$

$$= 10000 \text{ ppm} \cdot 0,01 \text{ L} = 100 \text{ mg}$$

Jadi, larutan stok 10000 ppm pada masing-masing ekstrak dibuat dengan cara dimasukkan 100 mg ekstrak pekat ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

#### b. Pembuatan larutan ekstrak 1000 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 10 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,001 \text{ L} = 1000 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 1000 ppm dibuat dengan cara dimasukkan 1000  $\mu\text{L}$  larutan stok ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dilarutkan dengan air laut hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

#### c. Pembuatan larutan ekstrak 500 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 500 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 5 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,0005 \text{ L} = 500 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 500 ppm dibuat dengan cara dimasukkan 500  $\mu\text{L}$  larutan stok ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dilarutkan dengan air laut hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

**d. Pembuatan larutan ekstrak 100 ppm**

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 100 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,0001 \text{ L} = 100 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 100 ppm dibuat dengan cara dimasukkan 100  $\mu\text{L}$  larutan stok ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dilarutkan dengan air laut hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

**e. Pembuatan larutan ekstrak 50 ppm**

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 50 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,00005 \text{ L} = 50 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 50 ppm dibuat dengan cara dimasukkan 50  $\mu\text{L}$  larutan stok ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dilarutkan dengan air laut hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

**f. Pembuatan larutan ekstrak 10 ppm**

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 10 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,1 \text{ L.ppm}/10000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,00001 \text{ L} = 10 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 10 ppm dibuat dengan cara dimasukkan 10  $\mu\text{L}$  larutan stok ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dilarutkan dengan air laut hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

**g. Pembuatan larutan ekstrak 5 ppm**

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,05 \text{ L.ppm}/10000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,000005 \text{ L} = 5 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 5 ppm dibuat dengan cara dimasukkan 5  $\mu\text{L}$  larutan stok ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dilarutkan dengan air laut hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

**h. Pembuatan larutan ekstrak 1 ppm**

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 1 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,01 \text{ L.ppm}/10000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,000001 \text{ L} = 1 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 1 ppm dibuat dengan cara dimasukkan 1  $\mu\text{L}$  larutan stok ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dilarutkan dengan air laut hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

**Lampiran 4. Data Analisis Kadar Air Sampel Segar dan Sampel Serbuk Kering Kulit Dahan Sirsak**

**L.4.1 Data Analisis Kadar Air Sampel Kulit Dahan Sirsak Segar**

Cawan		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>
Berat Cawan Sebelum Dipanaskan (g)		63,5222	53,4337	65,3967
Berat Cawan Setelah Dipanaskan (g)	I	63,5220	53,4335	65,3967
	II	63,5220	53,4334	65,3966
	III	63,5219	53,4333	65,3965
	IV	63,5219	53,4332	65,3963
	V	63,5218	53,4332	65,3961
Berat Rata-rata (g)		63,5219	53,4332	65,3963

Cawan + Sampel		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>
Berat Cawan + Sampel Sebelum Dipanaskan (g)		68,5173	58,4388	70,3956
Berat Cawan + Sampel Setelah Dipanaskan (g)	I	65,3194	55,2343	67,2268
	II	65,3051	55,2294	67,2022
	III	65,2999	55,2256	67,1866
	IV	65,2971	55,2080	67,1749
	V	65,2834	55,1898	67,1694
	VI	65,2829	55,1879	67,1628
	VII	65,2828	55,1876	67,1628
	VIII	65,2827	55,1876	67,1627
Berat Rata-rata (g)		65,2828	55,1877	67,1628

$$\text{Kadar air} = \frac{(b - c)}{(b - a)} \times 100\%$$

Keterangan:  $a$  = berat konstan cawan kosong  
 $b$  = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan  
 $c$  = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\begin{aligned} \text{Kadar air } A_1 &= \frac{(68,5173 - 65,2828)}{(68,5173 - 63,5219)} \times 100 \% = \frac{3,2345}{4,9954} \times 100 \% \\ &= 64,75 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar air } A_2 &= \frac{(58,4388 - 55,1877)}{(58,4388 - 53,4332)} \times 100 \% = \frac{3,2511}{5,0056} \times 100 \% \\ &= 64,95 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar air } A_3 &= \frac{(70,3956 - 67,1628)}{(70,3956 - 65,3963)} \times 100 \% = \frac{3,2328}{4,9993} \times 100 \% \\ &= 64,67 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar air rata - rata sampel kulit dahan sirsak segar} \\ &= \frac{64,75 \% + 64,95 \% + 64,67 \%}{3} = \frac{194,37 \%}{3} = 64,79 \% \end{aligned}$$

Kadar Air yang Terkandung dalam Sampel Kulit Dahan Sirsak Segar

Sampel	Kadar Air yang Terkandung (%)			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	Rata-rata
Kulit Dahan Sirsak Segar	64,75	64,95	64,67	64,79

#### L.4.2 Data Analisis Kadar Air Sampel Serbuk Kulit Dahan Sirsak Kering

Cawan	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	
Berat Cawan Sebelum Dipanaskan (g)	58,4104	59,5716	57,4364	
Berat Cawan Setelah Dipanaskan (g)	I	58,4056	59,5686	57,4336
	II	58,4043	59,5667	57,4326
	III	58,4042	59,5664	57,4322
	IV	58,4042	59,5663	57,4320
	V	58,4040	59,5661	57,4320
Berat Rata-rata (g)	58,4041	59,5663	57,4321	

Cawan + Sampel		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>
Berat Cawan + Sampel Sebelum Dipanaskan (g)		63,4069	64,5688	62,4338
Berat Cawan + Sampel Setelah Dipanaskan (g)	I	62,9866	64,1711	62,0325
	II	62,9860	64,1669	62,0219
	III	62,9719	64,1654	62,0167
	IV	62,9703	64,1534	62,0134
	V	62,9684	64,1530	62,0100
	VI	62,9684	64,1529	62,0062
	VII	62,9683	64,1528	62,0062
	VIII	62,9681	64,1526	62,0061
Berat Rata-rata (g)		62,9683	64,1528	62,0062

$$\text{Kadar air} = \frac{(b - c)}{(b - a)} \times 100\%$$

Keterangan:  $a$  = berat konstan cawan kosong  
 $b$  = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan  
 $c$  = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Kadar air } B_1 = \frac{(63,4069 - 62,9683)}{(63,4069 - 58,4041)} \times 100\% = \frac{0,4386}{5,0028} \times 100\% = 8,77\%$$

$$\text{Kadar air } B_2 = \frac{(64,5688 - 64,1528)}{(64,5688 - 59,5663)} \times 100\% = \frac{0,4160}{5,0025} \times 100\% = 8,32\%$$

$$\text{Kadar air } B_3 = \frac{(62,4338 - 62,0062)}{(62,4338 - 57,4321)} \times 100\% = \frac{0,4276}{5,0017} \times 100\% = 8,55\%$$

Kadar air rata – rata sampel serbuk kulit dahan sirsak kering

$$= \frac{8,77\% + 8,32\% + 8,55\%}{3} = \frac{25,64\%}{3} = 8,55\%$$

Kadar Air yang Terkandung dalam Sampel Serbuk Kulit Dahan Sirsak Kering

Sampel	Kadar Air yang Terkandung (%)			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	Rata-rata
Serbuk Kulit Dahan Sirsak Kering	8,77	8,32	8,55	8,55

## Lampiran 5. Perhitungan Rendemen

### L.5.1 Ekstrak N-heksana

$$\begin{aligned}
 \text{Berat sampel} &= 60,8176 \text{ g} \\
 \text{Berat vial kosong} &= 85,4448 \text{ g} \\
 \text{Berat vial + ekstrak pekat} &= 86,1656 \text{ g} \\
 \text{Berat ekstrak pekat} &= (\text{berat vial + ekstrak pekat}) - \text{berat vial kosong} \\
 &= 86,1656 \text{ g} - 85,4448 \text{ g} \\
 &= 0,7208 \text{ g}
 \end{aligned}$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{(1 - \text{kadar air}) \times \text{berat sampel}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,7208 \text{ g}}{(1 - 8,55 \%) \times 60,8176 \text{ g}} \times 100 \% = 1,30 \% \text{ (b/b)}$$

### L.5.1 Ekstrak Kloroform

$$\begin{aligned}
 \text{Berat sampel} &= 60,8176 \text{ g} \\
 \text{Berat vial kosong} &= 90,0383 \text{ g} \\
 \text{Berat vial + ekstrak pekat} &= 90,9074 \text{ g} \\
 \text{Berat ekstrak pekat} &= (\text{berat vial + ekstrak pekat}) - \text{berat vial kosong} \\
 &= 90,9074 \text{ g} - 90,0383 \text{ g} \\
 &= 0,8691 \text{ g}
 \end{aligned}$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{(1 - \text{kadar air}) \times \text{berat sampel}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,8691 \text{ g}}{(1 - 8,55 \%) \times 60,8176 \text{ g}} \times 100 \% = 1,56 \% \text{ (b/b)}$$

**L.5.1 Ekstrak Etanol**

$$\text{Berat sampel} = 60,8176 \text{ g}$$

$$\text{Berat vial kosong} = 85,9231 \text{ g}$$

$$\text{Berat vial + ekstrak pekat} = 89,4161 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak pekat} = (\text{berat vial + ekstrak pekat}) - \text{berat vial kosong}$$

$$= 89,4161 \text{ g} - 85,9231 \text{ g}$$

$$= 3,493 \text{ g}$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{(1 - \text{kadar air}) \times \text{berat sampel}} \times 100 \%$$

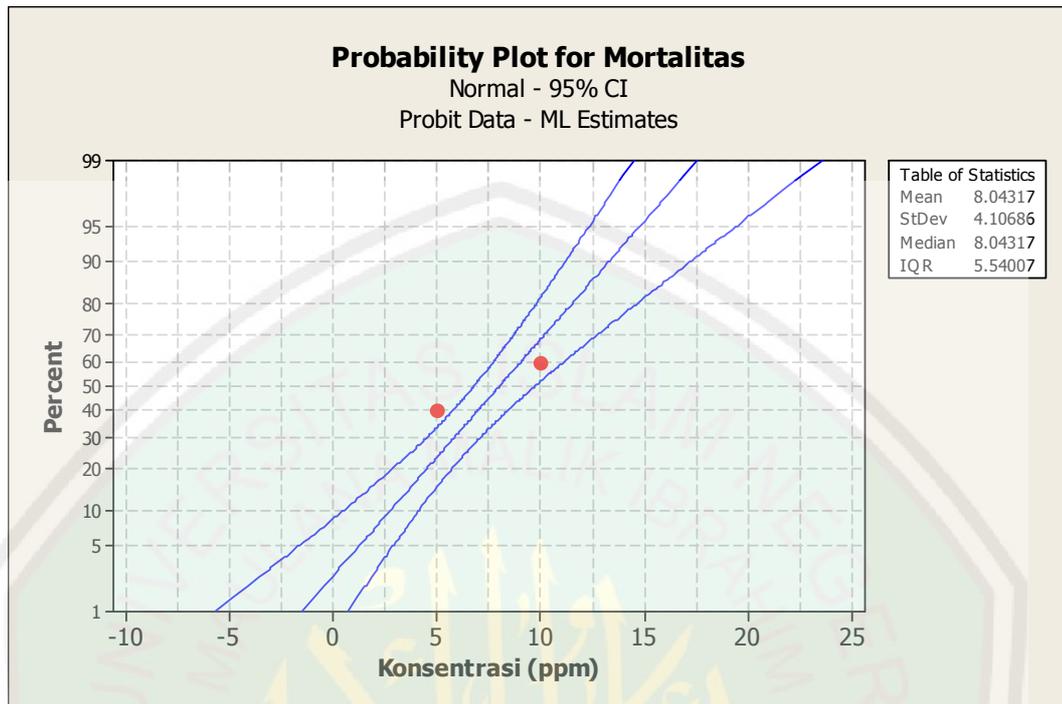
$$\% \text{ Rendemen} = \frac{3,493 \text{ g}}{(1 - 8,55 \%) \times 60,8176 \text{ g}} \times 100 \% = 6,28 \% \text{ (b/b)}$$

**Lampiran 6. Data Kematian Larva dan Perhitungan LC<sub>50</sub> Uji Toksisitas Masing-masing Ekstrak**

**L.6.1 Ekstrak N-heksana**

Konsentrasi (ppm)	Jumlah <i>A. salina</i> yang Mati				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0	0	0	0	0	0
1	0	0	1	0	0
5	1	4	4	4	40
10	6	5	6	6	60
50	10	10	10	10	100
100	10	10	10	10	100
500	10	10	10	10	100
1000	10	10	10	10	100

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Hewan Uji (Ekor)	Mortalitas
0	30	0
1	30	0
5	30	12
10	30	18
50	30	30
100	30	30
500	30	30
1000	30	30



11/4/2013 7:05:37 AM

Welcome to Minitab, press F1 for help.

### Probit Analysis: Mortalitas, Jumlah Hewan Uji versus Konsentrasi (ppm)

Distribution: Normal

#### Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	150
	Non-event	90
Jumlah Hewan Uji (Ekor)	Total	240

Estimation Method: Maximum Likelihood

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.95847	0.299461	-6.54	0.000
Konsentrasi (ppm)	0.243495	0.0420045	5.80	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -45.096

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	8.02651	6	0.236
Deviance	9.43107	6	0.151

## Tolerance Distribution

## Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	8.04317	0.697669	6.67576	9.41057
StDev	4.10686	0.708462	2.92868	5.75902

## Table of Percentiles

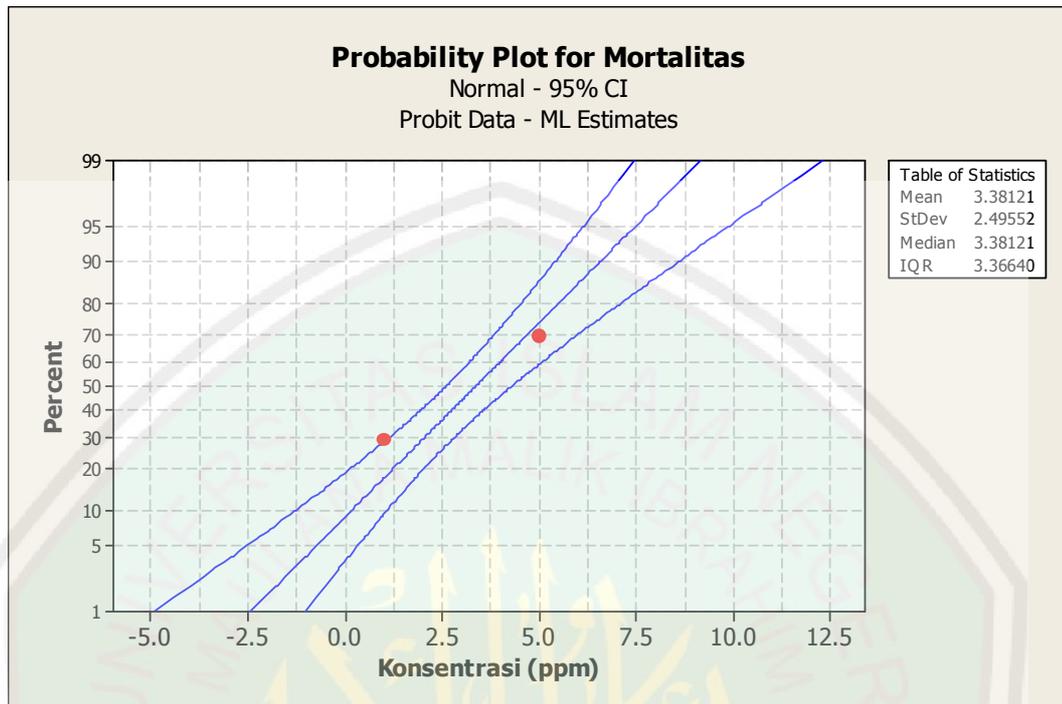
Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-1.51083	1.46108	-5.70153	0.698583
2	-0.391299	1.28866	-4.05145	1.57655
3	0.319005	1.18258	-3.01130	2.14037
4	0.853339	1.10504	-2.23346	2.56913
5	1.28798	1.04371	-1.60437	2.92152
6	1.65792	0.992997	-1.07200	3.22454
7	1.98230	0.949829	-0.607946	3.49296
8	2.27273	0.912356	-0.194929	3.73579
9	2.53687	0.879369	0.178371	3.95895
10	2.78001	0.850032	0.519796	4.16657
20	4.58674	0.675106	2.96246	5.80377
30	5.88953	0.619636	4.56310	7.14500
40	7.00271	0.634519	5.78503	8.43679
<b>50</b>	<b>8.04317</b>	<b>0.697669</b>	<b>6.81259</b>	<b>9.75874</b>
60	9.08363	0.797058	7.75823	11.1626
70	10.1968	0.930369	8.71099	12.7236
80	11.4996	1.10849	9.77913	14.5973
90	13.3063	1.37826	11.2134	17.2429
91	13.5495	1.41588	11.4037	17.6016
92	13.8136	1.45701	11.6099	17.9919
93	14.1040	1.50254	11.8361	18.4216
94	14.4284	1.55372	12.0880	18.9021
95	14.7984	1.61247	12.3745	19.4510
96	15.2330	1.68197	12.7102	20.0968
97	15.7673	1.76803	13.1217	20.8919
98	16.4776	1.88333	13.6668	21.9507
99	17.5972	2.06674	14.5227	23.6229

## Probability Plot for Mortalitas

### L.6.2 Ekstrak Kloroform

Konsentrasi (ppm)	Jumlah <i>A. salina</i> yang Mati				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0	0	0	0	0	0
1	3	0	3	3	30
5	9	7	7	7	70
10	10	9	10	10	100
50	10	10	10	10	100
100	10	10	10	10	100
500	10	10	10	10	100
1000	10	10	10	10	100

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Hewan Uji (Ekor)	Mortalitas
0	30	0
1	30	9
5	30	21
10	30	30
50	30	30
100	30	30
500	30	30
1000	30	30



11/4/2013 7:26:49 AM

Welcome to Minitab, press F1 for help.

**Probit Analysis: Mortalitas, Jumlah Hewan Uji versus Konsentrasi (ppm)**

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	180
	Non-event	60
Jumlah Hewan Uji (Ekor)	Total	240

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.35491	0.231303	-5.86	0.000
Konsentrasi (ppm)	0.400718	0.0643677	6.23	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -41.193

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	6.87155	6	0.333
Deviance	9.08257	6	0.169

## Tolerance Distribution

## Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	3.38121	0.407596	2.58234	4.18009
StDev	2.49552	0.400857	1.82151	3.41893

## Table of Percentiles

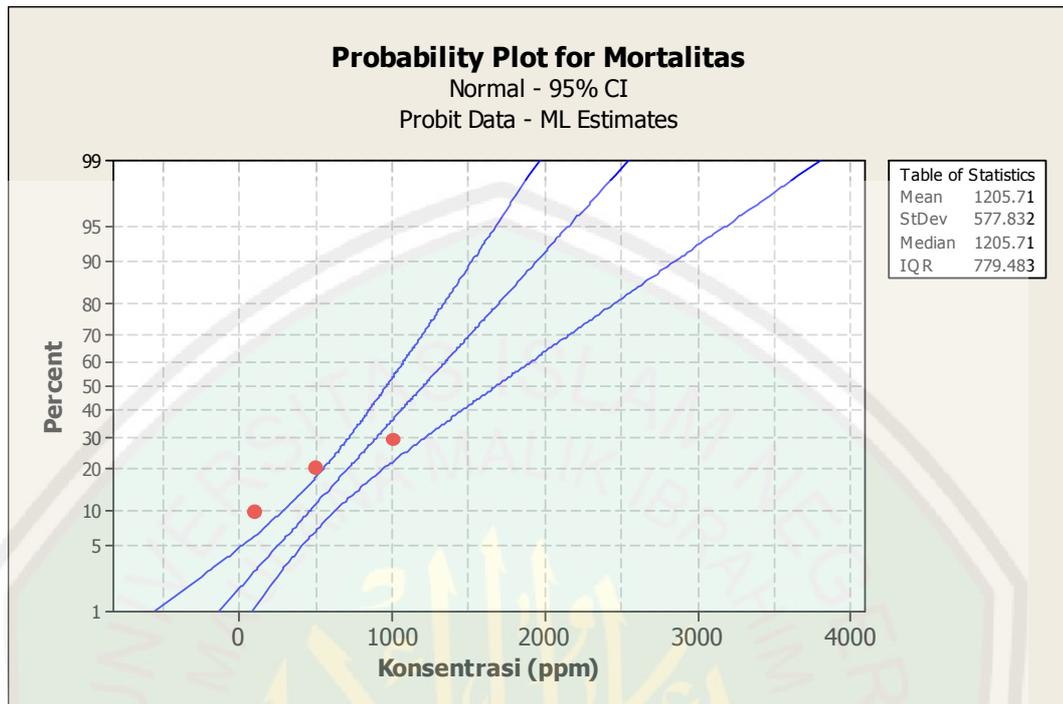
Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-2.42423	0.903376	-4.92943	-1.03516
2	-1.74396	0.806206	-3.96068	-0.493672
3	-1.31234	0.746292	-3.34956	-0.146586
4	-0.987658	0.702364	-2.89218	0.116847
5	-0.723551	0.667506	-2.52192	0.332924
6	-0.498755	0.638558	-2.20827	0.518329
7	-0.301652	0.613802	-1.93455	0.682189
8	-0.125170	0.592193	-1.69064	0.830069
9	0.0353329	0.573052	-1.46987	0.965629
10	0.183076	0.555907	-1.26765	1.09141
20	1.28093	0.447754	0.193769	2.06728
30	2.07256	0.401007	1.17877	2.83974
40	2.74898	0.390546	1.95355	3.56663
<b>50</b>	<b>3.38121</b>	<b>0.407596</b>	<b>2.61635</b>	<b>4.30742</b>
60	4.01345	0.447628	3.22721	5.10014
70	4.68986	0.509744	3.83820	5.99083
80	5.48149	0.599519	4.51661	7.06989
90	6.57935	0.742329	5.41915	8.60464
91	6.72709	0.762619	5.53840	8.81338
92	6.88760	0.784882	5.66751	9.04060
93	7.06408	0.809601	5.80897	9.29093
94	7.26118	0.837481	5.96642	9.57106
95	7.48598	0.869594	6.14535	9.89119
96	7.75008	0.907706	6.35479	10.2681
97	8.07477	0.955059	6.61127	10.7324
98	8.50638	1.01873	6.95076	11.3511
99	9.18666	1.12045	7.48310	12.3290

## Probability Plot for Mortalitas

### L.6.3 Ekstrak Etanol

Konsentrasi (ppm)	Jumlah <i>A. salina</i> yang Mati				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0
100	1	1	1	1	10
500	2	3	2	2	20
1000	3	2	3	3	30

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Hewan Uji (Ekor)	Mortalitas
0	30	0
1	30	0
5	30	0
10	30	0
50	30	0
100	30	3
500	30	6
1000	30	9



11/4/2013 7:37:00 AM

Welcome to Minitab, press F1 for help.

### Probit Analysis: Mortalitas, Jumlah Hewan Uji versus Konsentrasi (ppm)

Distribution: Normal

#### Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	18
	Non-event	222
Jumlah Hewan Uji (Ekor)	Total	240

Estimation Method: Maximum Likelihood

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.08661	0.211896	-9.85	0.000
Konsentrasi (ppm)	0.0017306	0.0003318	5.22	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -49.059

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	11.6591	6	0.070
Deviance	11.9373	6	0.063

#### Tolerance Distribution

#### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	1205.71	160.369	891.395	1520.03
StDev	577.832	110.795	396.817	841.421

#### Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-138.526	143.546	-560.840	79.7302
2	18.9907	119.717	-321.530	207.263
3	118.930	106.291	-173.353	291.836
4	194.110	97.4641	-64.7133	358.285
5	255.263	91.3390	21.2527	414.740
6	307.315	87.0352	92.3034	464.912
7	352.953	84.0592	152.707	510.797
8	393.817	82.0974	205.098	553.575
9	430.981	80.9330	251.235	593.990
10	465.191	80.4063	292.367	632.530
20	719.397	92.3541	559.264	957.658
30	902.697	113.868	721.327	1222.49
40	1059.32	136.801	849.767	1458.81
<b>50</b>	<b>1205.71</b>	<b>160.369</b>	<b>965.291</b>	<b>1684.22</b>
60	1352.10	185.197	1078.20	1912.24
70	1508.73	212.654	1197.18	2158.03
80	1692.03	245.555	1334.87	2447.23
90	1946.23	292.050	1524.09	2850.04
91	1980.44	298.362	1549.44	2904.35
92	2017.61	305.231	1576.96	2963.39
93	2058.47	312.797	1607.20	3028.32
94	2104.11	321.262	1640.93	3100.87
95	2156.16	330.935	1679.37	3183.66
96	2217.31	342.321	1724.49	3280.96
97	2292.49	356.350	1779.90	3400.64
98	2392.43	375.044	1853.46	3559.83
99	2549.95	404.597	1969.23	3810.90

#### Probability Plot for Mortalitas

## Lampiran 7. Perhitungan Nilai Rf Hasil KLT Ekstrak Kloroform

### L.7.1 Fase Gerak N-heksana : Etil asetat (8:2)

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{0,3 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,04$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{2,3 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,27$$

$$Rf \text{ noda 3} = \frac{3,4 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,40$$

$$Rf \text{ noda 4} = \frac{3,8 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,45$$

$$Rf \text{ noda 5} = \frac{4,5 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,53$$

### L.7.2 Fase Gerak N-heksana : Etil asetat (7:3)

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{0,2 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,02$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{0,8 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,09$$

$$Rf \text{ noda 3} = \frac{5,0 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,59$$

$$Rf \text{ noda 4} = \frac{5,6 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,66$$

### L.7.3 Fase Gerak N-heksana : Etil asetat (6:4)

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{0,3 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,04$$

### L.7.4 Fase Gerak Benzene : Kloroform (3:7)

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{0,3 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,04$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{0,4 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,05$$

### L.7.5 Fase Gerak Benzene : Etil asetat (8:2)

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{0,6 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,07$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{1,4 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,16$$

$$Rf \text{ noda 3} = \frac{1,9 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,22$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{2,3 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,27$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{3,4 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,40$$

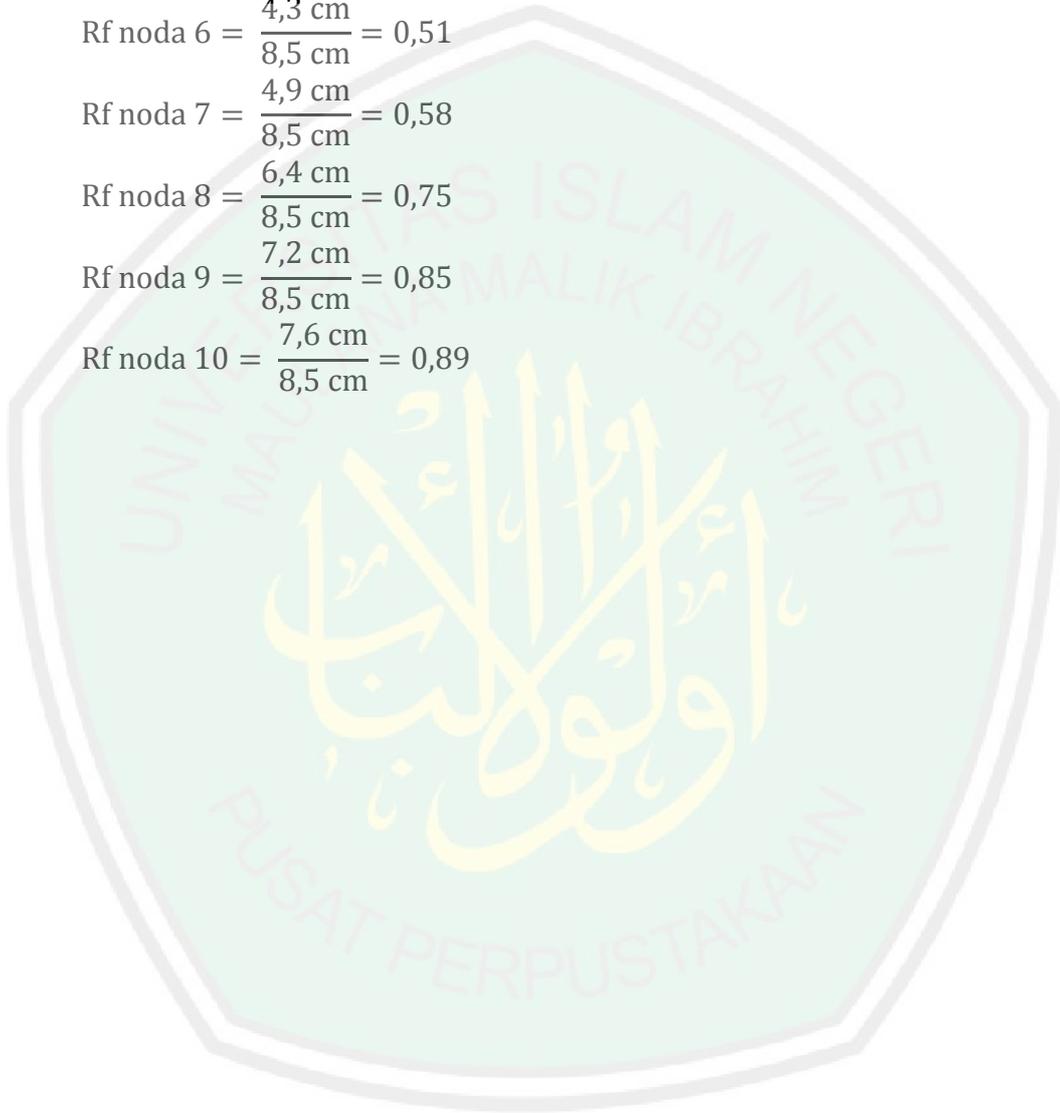
$$\text{Rf noda 6} = \frac{4,3 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,51$$

$$\text{Rf noda 7} = \frac{4,9 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,58$$

$$\text{Rf noda 8} = \frac{6,4 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,75$$

$$\text{Rf noda 9} = \frac{7,2 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,85$$

$$\text{Rf noda 10} = \frac{7,6 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,89$$



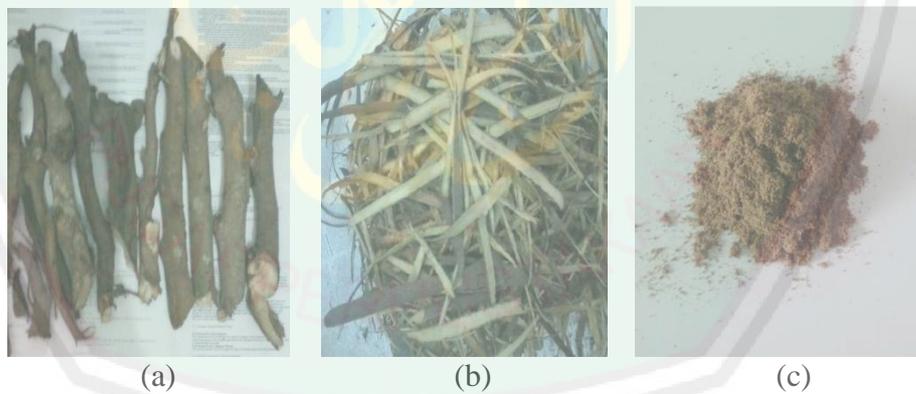
## Lampiran 8. Dokumentasi

### L.8.1 Analisis Kadar Air



Gambar 8.1 (a) Sampel segar kulit dahan sirsak (b) Sampel serbuk kering kulit dahan sirsak

### L.8.2 Preparasi Sampel



Gambar 8.2 (a) Dahan sirsak (b) Kulit dahan sirsak (c) Serbuk kulit dahan sirsak

### L.8.3 Ekstraksi Komponen Aktif



Gambar 8.3 (a) Perendaman sampel serbuk kulit dahan sirsak dalam pelarut n-heksana (b) Perendaman sampel serbuk kulit dahan sirsak dalam pelarut kloroform (c) Perendaman sampel serbuk kulit dahan sirsak dalam pelarut etanol (d) Filtrat ekstrak n-heksana (e) Filtrat ekstrak kloroform (f) Filtrat ekstrak etanol (g) Pemekatan ekstrak dengan *rotary vacuum evaporator* (h) Ekstrak pekat n-heksana

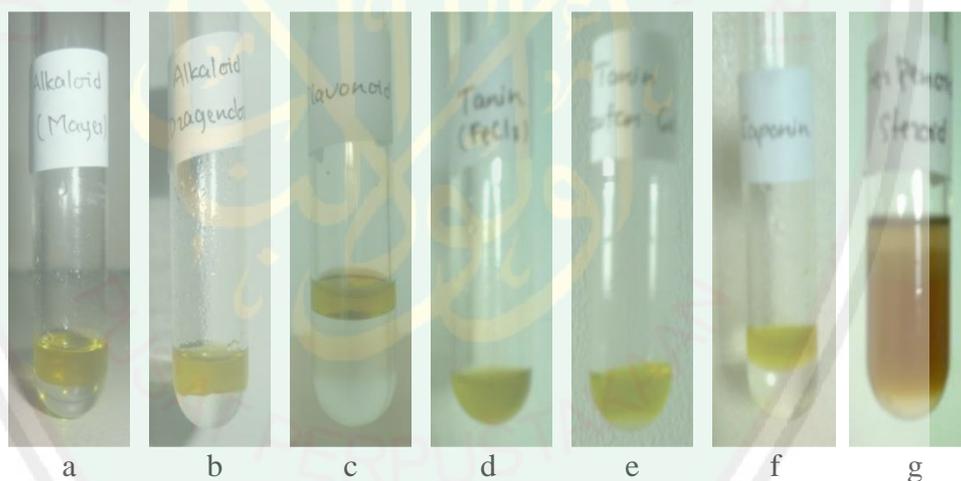
#### L.8.4 Uji Toksisitas dengan Larva Udang *Artemia salina* Leach



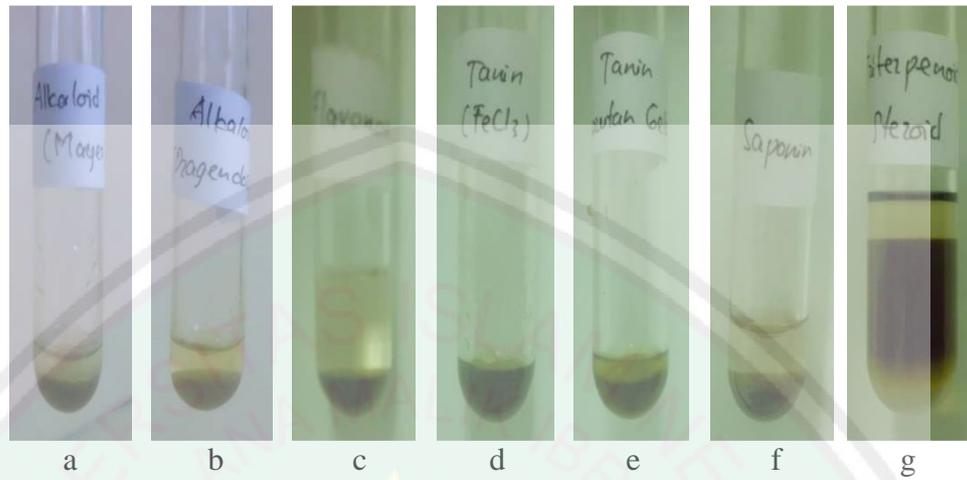
Gambar 8.4 (a) Proses penetasan telur *A. salina* (b) Uji toksisitas terhadap larva *A. salina*

#### L.8.5 Uji Fitokimia Komponen Aktif dengan Uji Reagen

##### Ekstrak n-heksana



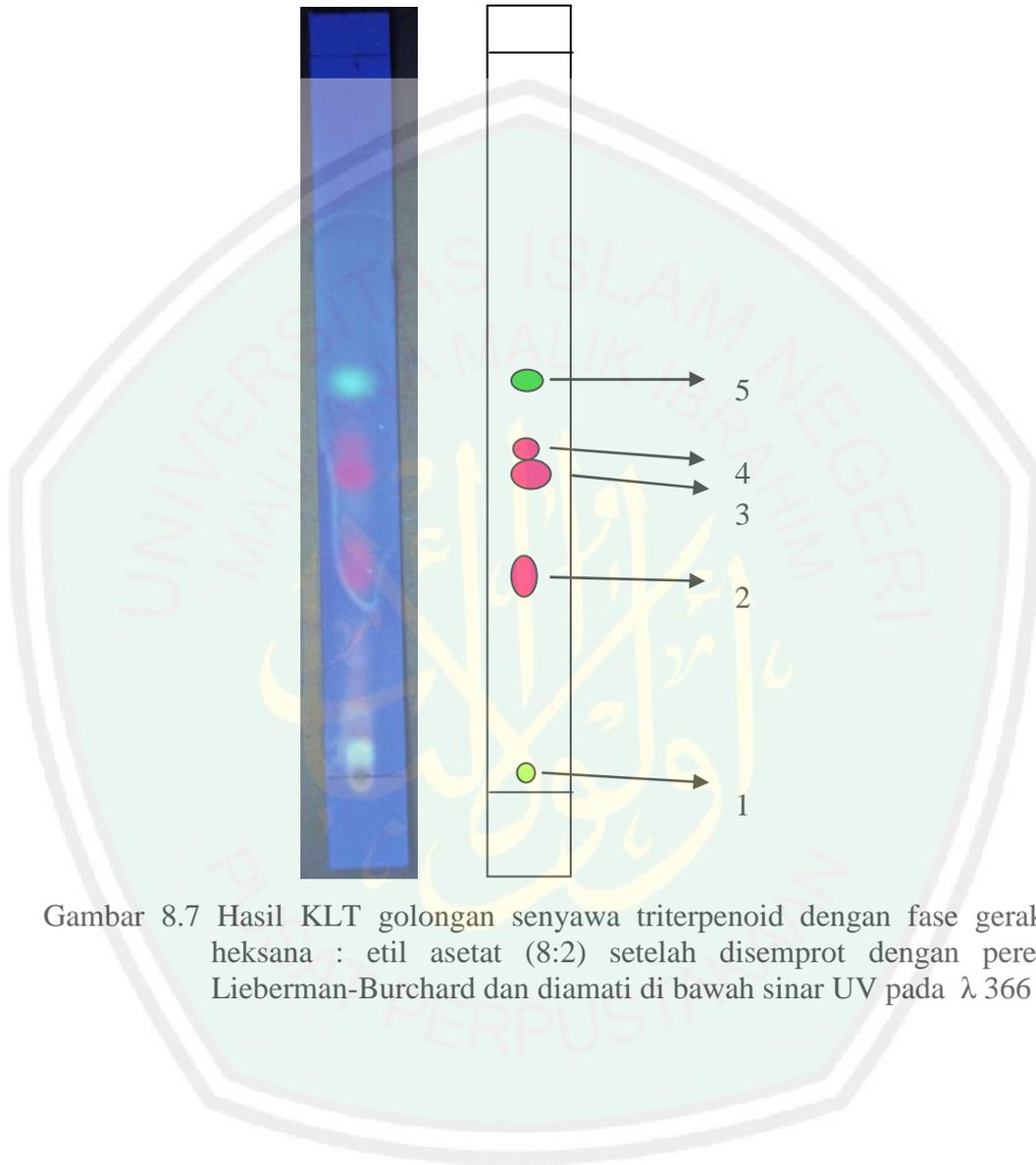
Gambar 8.5 (a) uji alkaloid dengan reagen Mayer. (b) uji alkaloid dengan reagen Dragendorff. (c) uji flavonoid. (d) uji tanin dengan  $\text{FeCl}_3$ . (e) uji tanin dengan larutan gelatin. (f) uji saponin (g) uji triterpenoid dan steroid

**Ekstrak kloroform**

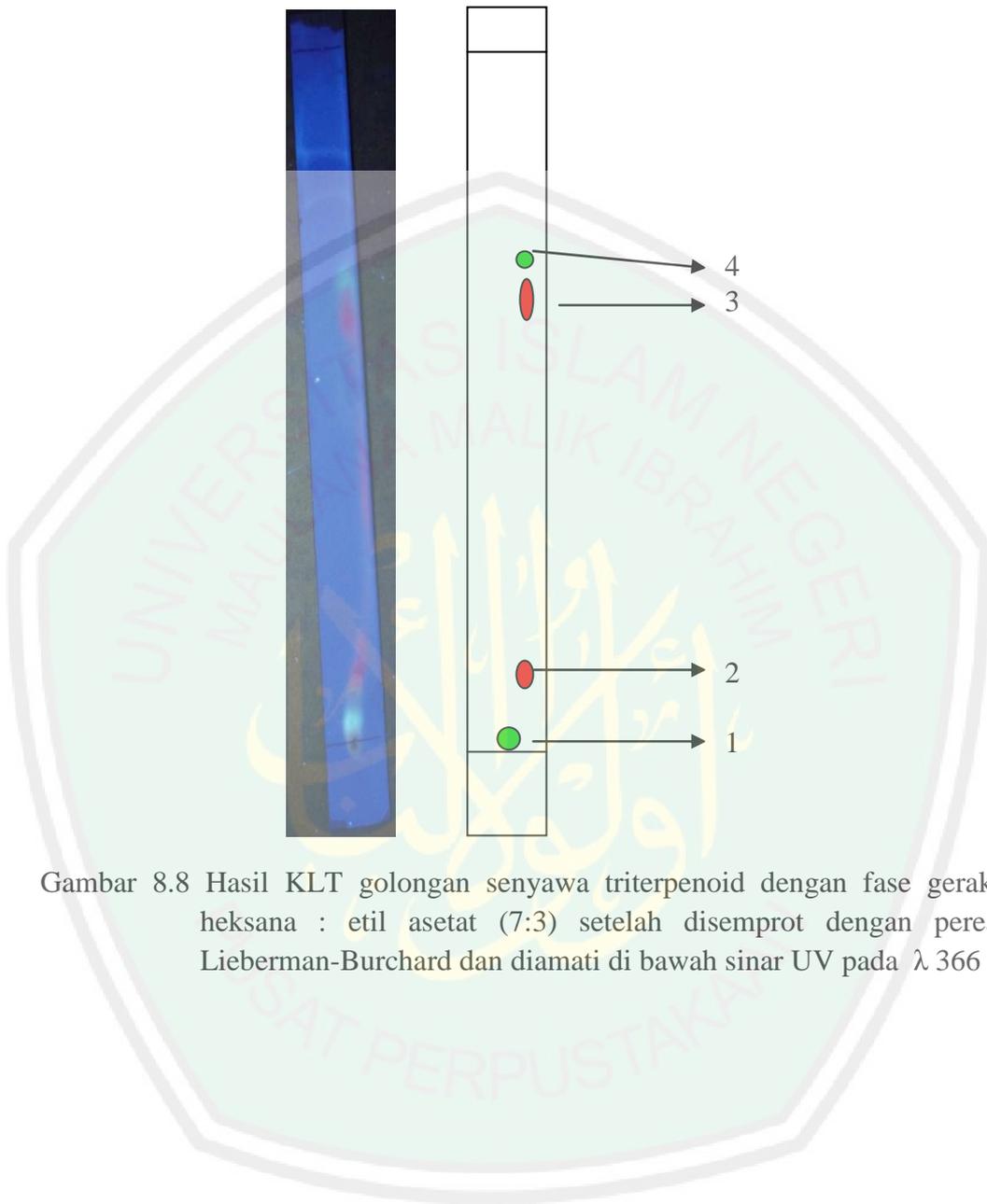
Gambar 8.6 (a) uji alkaloid dengan reagen Mayer. (b) uji alkaloid dengan reagen Dragendorff. (c) uji flavonoid. (d) uji tanin dengan  $\text{FeCl}_3$ . (e) uji tanin dengan larutan gelatin. (f) uji saponin. (g) uji triterpenoid dan steroid

### L.8.6 Uji Fitokimia Komponen Aktif dengan KLT

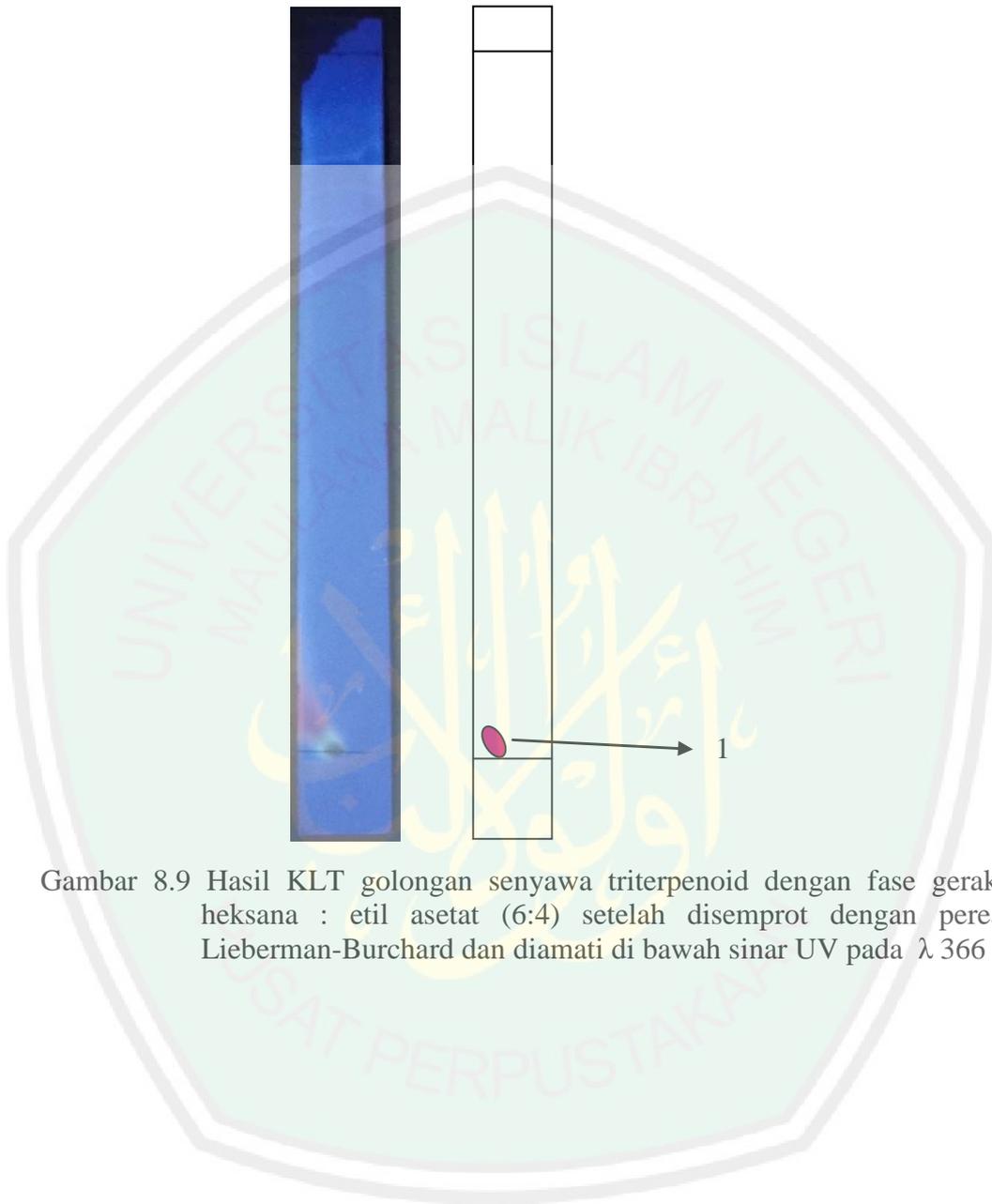
#### Ekstrak Kloroform



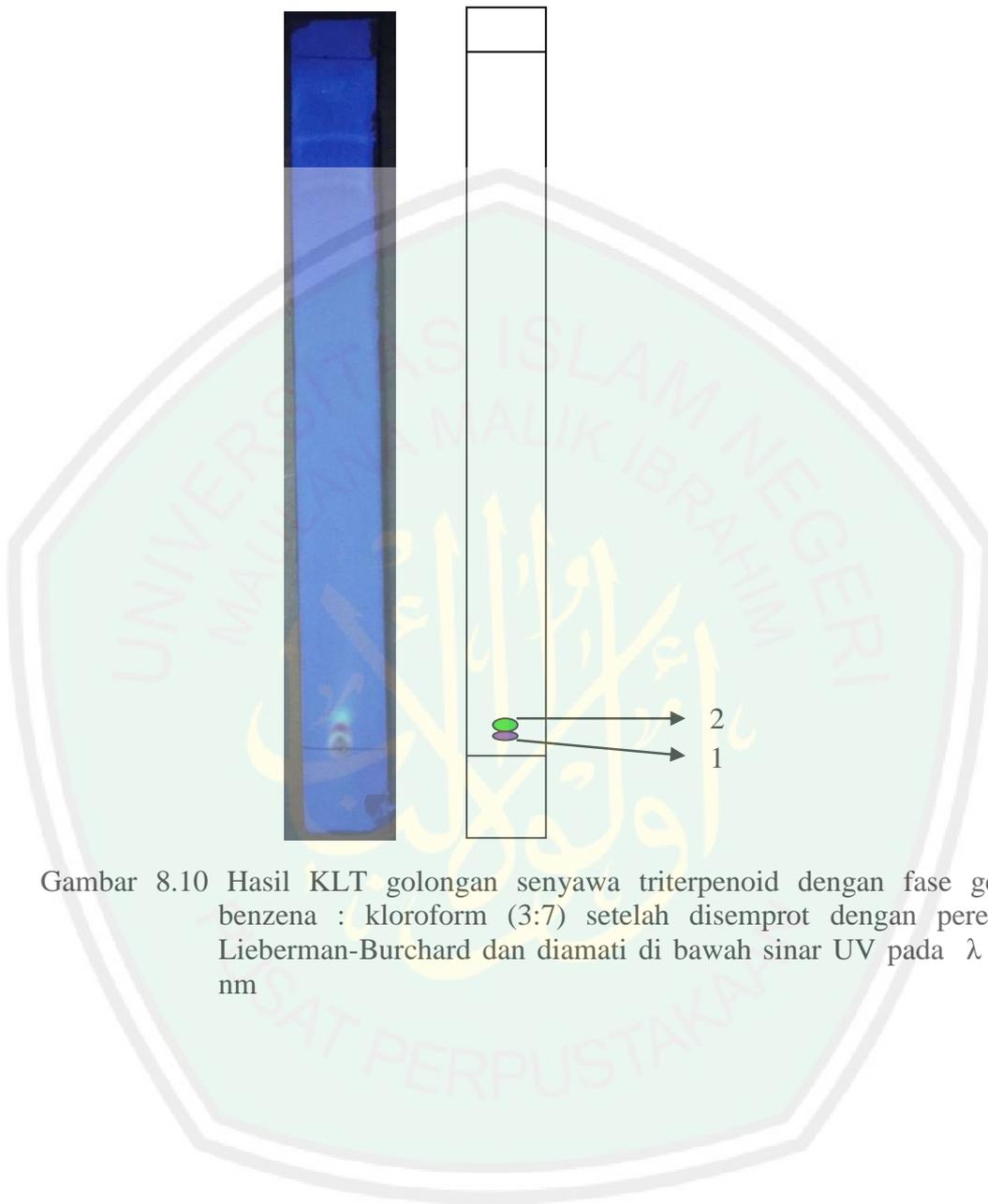
Gambar 8.7 Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (8:2) setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard dan diamati di bawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm



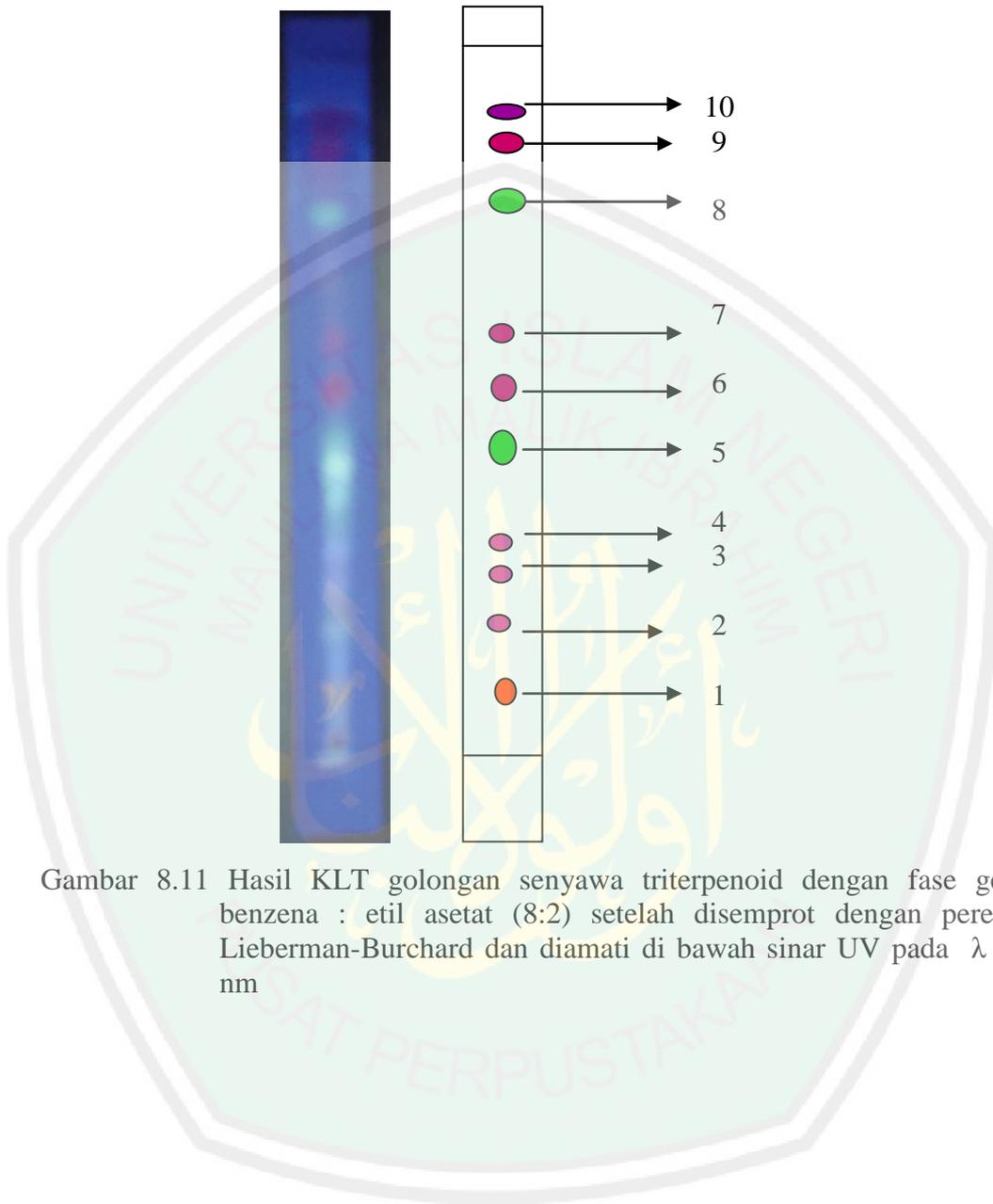
Gambar 8.8 Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (7:3) setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann-Burchard dan diamati di bawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm



Gambar 8.9 Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (6:4) setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann-Burchard dan diamati di bawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm



Gambar 8.10 Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid dengan fase gerak benzena : kloroform (3:7) setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann-Burchard dan diamati di bawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm



Gambar 8.11 Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid dengan fase gerak benzena : etil asetat (8:2) setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann-Burchard dan diamati di bawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm