

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF FRAKSI ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn) SEBAGAI PENGHAMBAT OKSIDASE XANTHINE

Slamet¹, Siswa Setyahadi², Partomuan Simanjuntak³

¹email: slamet93ffua@gmail.com

^{1,2,3}Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila,

Jl. Srengseng Sawah Pasar Minggu Jagakarsa Jakarta Selatan-12640

¹Stikes Muhammadiyah Pekajangan,

Jl. Raya Pekajangan Pekalongan-51172

^{1,2}Pusat Teknologi Bioindustri.Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Laptiap,
Kawasan Puspitek, Serpong-15314

³Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)
Cibinong, Bogor-16912

Abstrak

Annona muricata Linn (Sirsak) sudah digunakan masyarakat untuk pengobatan berbagai penyakit seperti kanker, diabetes, gout dan lainnya. Khasiat sirsak juga telah dipelajari adalah sebagai antioksidan, antigout, antibakteri, antimalaria, antimollusca, analgesik, antiinflamasi, antiparasit, antihipertensi, dan antidepresi. Gout adalah penyakit degeneratif yang penderitanya sangat terganggu. Gout sangat berkaitan banyaknya asam urat pada peredaran darah dan pengendapan pada persediaan tulang. Prevalensi gout cenderung meningkat di masa depan dan telah menyerang usia muda. Prevalensi gout di Indonesia telah menyerang usia di bawah 34 tahun yaitu sebesar 32% dan tertinggi terjadi pada populasi di Minahasa sebesar 29,2%. Tujuan penelitian ini menentukan aktifitas penghambatan terhadap enzim xantin oksidase oleh beberapa ekstrak *Annona muricata* Linn (sirsak). Ekstrak hasil terbaik dari uji ini dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom dan kromatografi preparatif untuk mendapatkan fraksi dengan senyawa aktif yang lebih sedikit. pada pemisahan terakhir didapat 3 fraksi dan diuji lagi dengan uji aktivitas penghambatan terhadap xantine oksidase. Hasil pengujian tersebut didapat fraksi E.4.1.3 dengan IC₅₀ 0,02 ppm. Fraksi E.4.1.3 dilakukan analisa secara LC-MS dan FT-IR untuk menentukan zat yang menghambat aktivitas xanthine oxidase. Hasil yang diperoleh dan dikaitkan dengan data yang ada bahwa zat ini diduga Quercetin 3- (2-galloylglucosida).

Kata kunci : *Annona muricata* Linn, xantin oksidase, xantin, inhibisi asam urat, Quercetin 3- (2-galloylglucosida)

1. Pendahuluan

Annona muricata L (sirsak) banyak digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan berbagai penyakit seperti penyakit kanker, diabetes melitus, dan banyak lagi lainnya. Khasiat *Annona muricata* L (sirsak), yang sudah diketahui dan diteliti yaitu sebagai antioksidan, anti gout, anti bakteri, anti malaria, antimollusca, analgesik, anti inflamasi, cacingan atau parasit, hipertensi, depresi atau stres, dan menormalkan syaraf yang tertekan.^[1]

Sirsak (*Annona muricata* L) merupakan salah satu tanaman buah yang berasal dari Karibia, Amerika Tengah dan Amerika Selatan. Buah sirsak rasanya manis agak asam sehingga sering dipakai sebagai bahan jus buah. Daging buahnya kaya akan serat. Setiap 100 g buah yang dapat dimakan

mengandung 3.3 g serat sehingga dapat memenuhi 13% kebutuhan serat per hari. Selain itu, daging buahnya mengandung banyak karbohidrat (terutama fruktosa), vitamin C (20 mg/100 g), B1 dan B2.^[2]

Awal tahun 90-an ditemukan semacam “jamu herbal” dari suku-suku (tribes) di Amazon yang dapat menyembuhkan beberapa penyakit berbahaya termasuk kanker^[3]. Setelah diteliti oleh para ahli farmasi dari AS, ternyata ramuan tersebut berasal dari daun pohon Graviola. Daun tersebut mengandung zat anti-kanker yang disebut acetogenins, yang dapat membunuh sel-sel kanker tanpa mengganggu sel-sel sehat dalam tubuh manusia.^[4]

Acetogenins adalah senyawa polyketides dengan struktur 30 – 32 rantai karbon tidak bercabang yang terikat pada

gugus 5-methyl-2-furanone. Rantai furanone dalam gugus hydrofuranone pada C23 memiliki aktivitas sitotoksik.^[5]

Seiring perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi serta pola hidup masyarakat berdampak munculnya berbagai penyakit degenerative. Diantara penyakit degeneratif salah satunya adalah gout. Gout merupakan salah satu penyakit yang berbahaya dan mengakibatkan cacat pada fisik. Penyakit ini juga berkaitan erat dengan ginjal, karena ginjal menjadi tempat pembuangan asam urat yang berlebihan. Ketika ginjal tidak mampu untuk membuang asam urat berlebihan, maka terbentuk asam urat. Hal ini mengindikasikan ginjal rusak dan berpengaruh pada fungsi tubuh.^[1]

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya inhibisi dari ekstrak etanol, fraksi, isolat dari *Annona muricata* L (sirsak) serta mengetahui fraksi aktif yang berperan menghambat aktivitas enzim xanthine oksidase.

2. Metode Penelitian

Bahan :Daun *Annona muricata* (sirsak) diambil dari perkebunan disekitar Yogyakarta dan dideterminasi oleh Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong. Bahan kimia yang digunakan adalah aquades, etanol 96%, hexana, etil asetat, enzim xantin oksidase, substrat xantin, metanol, diklormetan., dapar fosfat, NaOH, DMSO.

Alat: Spectrofotometri UV, mikropipet Socorex, LC-MS, FT-IR Spectrofotometri dan alat gelas laboratorium lainnya, silika gel, kolom kromatografi, pH meter

a. Pembuatan simplisia

Daun *Annona muricata* L (sirsak) yang diambil adalah daun yang terletak pada helai keempat dari pucuk ke arah daun yang lebih tua. Serbuk daun sirsak dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C hingga kadar air kurang dari 10%. Daun *Annona muricata* L (sirsak) kemudian dihaluskan hingga diperoleh serbuk daun sirsak kering berukuran 80 mesh.

b. Ekstraksi

Ekstraksi dengan metode maserasi bertingkat mulai dari *n*-heksan; etil asetat; etanol 96%; air dan infudasi dengan air dengan perbandingan 1:10. Hasil maserasi dan infudasi disaring dan filtratnya dikumpulkan. Filtrat kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak daun *Annona muricata* L (sirsak). Selanjutnya dikeringkan dan didapat ekstrak kering.

c. Uji Aktivitas daya hambat enzim Xantin Oksidase (XO).

Uji ini melalui rangkaian tahap, ()

1) Pembuatan larutan xanthine 100 µg/ml.

Xanthine murni ditimbang sebanyak 100 mg. dilarutkan dengan beberapa tetes NaOH 0,01 N, kemudian disonifikasi sampai larut (jika perlu ditambahkan beberapa tetes NaOH 0,2 N, lalu ditambah dapar fosfat sampai 100,0 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/ml. Dari larutan xanthine 1 mg/ml diambil 1,0 ml kemudian ditambah dapar fosfat sampai 10,0 ml untuk membuat larutan xanthine konsentrasi 100 µg/ml.

2) Pembuatan larutan xanthine oxidase 50 mU/ml.

Xanthine oxidase sebanyak 25 unit dilarutkan dalam 10 ml dapar fosfat pH 7,5 sehingga diperoleh konsentrasi 2,5 unit/ml (larutan I). Dari larutan I diambil 1,0 ml, kemudian ditambah dapar fosfat pH 7,5 sampai 25,0 ml sehingga diperoleh konsentrasi 100 mU/ml (larutan II). Untuk membuat larutan *xanthine oxidase* konsentrasi 50 mU/ml, dari larutan II diambil 5,0 ml kemudian ditambah dapar fosfat pH 7,5 sampai 10,0 ml.

3) Pembuatan larutan induk (larutan uji).

Ekstrak etanol dijadikan larutan induk dengan cara melarutkan 100,0 mg ekstrak etanol dengan beberapa tetes DMSO, kemudian ditambah dapar fosfat pH 7,5 sampai volume 100,0 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/ml. Dari larutan induk (1 mg/ml) dibuat larutan uji dengan konsentrasi

5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml dan 50, µg/ml. Pembuatan larutan induk juga dilakukan terhadap hasil fraksinasi kromatografi kolom ke 1,2 dan fraksinasi hasil kromatografi preparatif.

4) Pembuatan larutan pembanding Allopurinol.

Larutan pembanding Allopurinol dibuat dengan cara melarutkan 100 mg Allopurinol dengan air bebas CO sampai volume 250 ml sehingga diperoleh konsentrasi 400 µg/ml. Dari larutan 400 µg/ml dibuat larutan pembanding Allopurinol dengan konsentrasi antara 10 µg/ml sampai 100 µg/ml. Dari konsentrasi 100 µg/ml dibuat larutan dengan konsentrasi antara 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ; 10 µg/ml dan 20 µg/ml.

5) Penentuan aktivitas xanthine oxidase

Aktivitas *xanthine oxidase* ditentukan dengan menambahkan 200 µl substrat (*xanthine*) 100 µg/ml ke dalam campuran 100 µl *xanthine oxidase* 50 mU/ml dan 724 µl bufer fosfat pH 7,5. aktivitas *xanthine oxidase* ditentukan dengan mengamati kecepatan pembentukan asam urat dari Xanthine secara spektrofotometri pada 295 nm dari menit ke-0 sampai menit ke-3 pada suhu 25°C. Data yang diperoleh adalah berupa rate $\Delta(A_{295}/\text{menit})$.

6) Penentuan penghambatan aktivitas enzim xanthine oxidase

Penghambatan aktivitas enzim *xanthine oxidase* dilakukan penambahan 200 µl larutan uji menggunakan konsentrasi 10 µg/ml, 15 µg/ml dan 20 µg/ml ke dalam campuran bufer fosfat dan *xanthine oxidase*. Dengan cara yang sama, ditentukan pula penghambatan aktivitas dibandingkan dengan produk komersil yang ada dipasaran, yaitu allopurinol. Selain itu dibuat blanko dengan perlakuan sama yang berbeda tanpa ekstrak. Dan pengukuran serapan dilakukan untuk mendapatkan data serapan blanko.

7) Penentuan IC₅₀

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi yang terbaik ekstrak daun *Annona muricata* L(Sirsak). Pengujian inhibisi xantin oksidase dilakukan terhadap sampel dengan berbagai konsentrasi yaitu, 20 mg/mL, 40 mg/mL, 60 mg/mL dan 80 mg/mL. Setelah itu dilakukan penentuan nilai IC₅₀. Inhibition concentration 50 atau IC₅₀ merupakan nilai konsentrasi minimal ekstrak yang dapat menghambat enzim sampai 50%. Nilai IC diperoleh dari persamaan $y = a + bx$ yang dihasilkan dari plot hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan nilai persentase inhibisi dengan a adalah nilai konsentrasi ekstrak dan b adalah persentase inhibisi xantin oksidase.

3. Hasil dan Pembahasan

a. Hasil Ekstraksi

Ekstraksi simplisia daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dapat dilihat pada tabel 1 berikut:

Tabel 1: Hasil ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn)

No	Sampel Bobot (g)	Rendemen	(%)*
1	Heksana	36,00 ±5,21	2,87
2	Etil Asetat	44,05±4,63	3,40
3	Etanol	48,98±4,84	3,59
4	Air	13,75±4,47	1,07
5	infudasi	41,00±1,21	3,15

* dihitung terhadap 1kg simplisia kering.

Tabel 1, menyatakan rendemen ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terbanyak pada ekstrak etanol 96% . Hal ini menunjukkan senyawa aktif terbanyak terdapat pada ekstrak etanol 96%, Senyawa tersebut terlarut pada etanol berdasarkan sifat kepolaran yang sama dengan etanol 96%.

b. Hasil Penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa (*class of compound*) yang terkandung di dalam ekstrak sirsak (*Annona muricata* Linn). Hasil penapisan fitokimia tertera pada tabel 2. Tabel 2 menunjukkan bahwa

ekstrak etanol 96% relatif memiliki kandungan komponen senyawa yang lebih bervariasi dibandingkan ekstrak lainnya.

Tabel 2. Hasil Penapisan Fitokimia

	Kandungan senyawa	Ekstrak n-Hexana	Eksrak Etil Asetat	Ekstrak Etanol 96%	Air	Infudasi
1	Alkaloid	-	+	+	-	-
2	Flavonoida	-	+	+	+	+
3	Terpenoid	-	-	-	-	-
4	Tannin	-	-	+	+	+
5	Saponin	-	-	+	+	+

*Keterangan : - = tidak terdeteksi
+ = terdeteksi

c. Uji aktivitas daya hambat terhadap xanthine oksidase oleh ekstrak
Penghambatan xantin oksidase dapat ditentukan dengan uji aktivitas daya hambat xantin oksidase oleh beberapa ekstrak ditunjukkan pada tabel 3 berikut:

Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Penghambatan terhadap Xanthine Oksidase oleh beberapa ekstrak.

No	Ekstrak	Konsentrasi (ppm) N=3	% inhibisi	Persamaan regresi	IC 50 (ppm)
1	N-hexana	2,5	16,13	Y =	4.944,35
		5	17,74	4,56 ln	
		10	20,43	(x) +	
		20	25,81	11,07	
2	Etil Asetat	2,5	44,62	Y =	6,90
		5	47,85	6,29	
		10	51,08	ln(x) +	
		20	56,98	38,76	
3	Etanol 96%	2,5	45,69	Y = 6,29	5,13
		5	49,47	ln (x)	
		10	54,31	+39,72	
		20	58,60		
4	Air	2,5	46,77		5,71
		5	48,92	Y= 5,66 ln	
		10	51,61		
		20	58,60		
5	Infudasi	2,5	46,77		5,32
		5	49,47	Y= 5,20	
		10	51,61	ln (x) +	
		20	58,06	41,32	

*keterangan: N = jumlah pengulangan percobaan

Tabel 4 menyatakan bahwa aktivitas penghambatan xanthine oksidasi paling baik ditunjukkan oleh ekstrak etanol diikuti berturut turut oleh ekstrak hasil infudasi, air, etil asetat dan n-hexana. Ekstrak etanol 96% digunakan untuk penelitian selanjutnya.

d. Uji aktivitas penghambatan xantin oksidase terhadap fraksi E 1 – 6

Hasil uji aktivitas daya hambat xantin oksidase terhadap fraksi E.1-6 kromatografi kolom yang terdiri dari 6 fraksi disajikan pada tabel 4 dibawah ini:

Tabel 4. Hasil uji aktivitas penghambatan fraksi E.1-6 terhadap xanthine oksidase

N	Fraksi	Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi	Persamaan Regresi	IC50 (ppm)
1	E.1	7,06	18,10		
		14,13	35,43	Y=20,64	30,97
		28,25	49,14	ln(x)-	
		56,50	61,21	20,86	
2	E.2	6,5	8,62		
		13	13,79	Y=9,82l	483,71
		26	19,81	n(x)+4,9	
		52	29,31	1	
3	E.3	6,38	12,93		
		12,75	15,52	Y=4,34l	32,37
		25,5	19,83	n(x)+4,9	
		51	21,55	1	
4	E.4	6,38	55,17		
		12,75	60,34	Y=7,06l	2,98
		25,5	65,52	n(x)+42,	
		51	69,83	29	
5	E.5	6,38	51,72		
		12,75	56,90	Y=7,24l	4,96
		25,5	62,07	n(x)+38,	
		51	66,81	41	
6	E.6	6,38	55,90		
		12,75	59,48	Y=8,01l	3,63
		25,5	64,93	n(x)+39,	
		51	72,83	69	

Hasil uji aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase terhadap 6 fraksi yaitu fraksi E.1-6 menunjukan fraksi E.4, fraksi

yang paling aktif karena memiliki IC_{50} yang paling kecil. Fraksi E.4 dilakukan pemisahan secara kromatografi kolom II, serta didapat 5 fraksi.

e. Uji aktivitas penghambatan xantin oksidase oleh fraksi E.4.1-5

Hasil uji aktivitas daya penghambat enzim xantin oksidase terhadap fraksi E.4.1-5 disajikan pada tabel 7 dibawah ini:

Tabel 5. Hasil uji aktivitas penghambatan xantin oksidase oleh fraksi E.4.1-5

No	Fraksi	Konsentrasi (ppm)	% Inhibitor	Persamaan Regresi	IC50 (ppm)
1	E.4.1	2	52	$Y=10,951n(x)+44,60$	1,64
		4	62		
		8	66		
		16	75		
2	E.4.2	2	49	$Y=8,94ln(x)+42,50$	2,31
		4	54		
		8	62		
		16	67		
3	E.4.3	2	51	$Y=6,06ln(x)+47,14$	1,67
		4	55		
		8	58		
		16	65		
4	E.4.4	2,7	51,01	$Y=1,70ln(x)+49,25$	2,12
		5,4	52,00		
		10,8	53,30		
		21,60	54,50		
5	E.4.5	2,6	46	$Y=6,79ln(x)+39,21$	4,90
		5,6	50		
		10,4	55		
		20,8	60,01		

Hasil uji aktivitas penghambatan terhadap xantin oksidase oleh E.4.1-5 menunjukkan fraksi E.4.1, fraksi yang paling aktif karena memiliki IC_{50} yang paling kecil yaitu 1,64 ppm. Fraksi E.4.1 dilakukan isolasi lebih lanjut dengan kromatografi preparatif sehingga didapat 3 fraksi. Ke 3 fraksi dilakukan uji aktivitas penghambatan terhadap xantin oksidase.

f. Uji aktivitas penghambatan xantin oksidase terhadap fraksi E.4.1.1-3

Hasil uji aktivitas penghambat terhadap xantin oksidase oleh fraksi E.4.1.1-3 hasil isolasi kromatografi preparatif dan pembanding Allupurunol disajikan pada tabel 8 dibawah ini :

Tabel 6: Hasil uji aktivitas penghambatan terhadap enzim xanthine oxidase oleh E.4.1.1-3 dan Allopurinol.

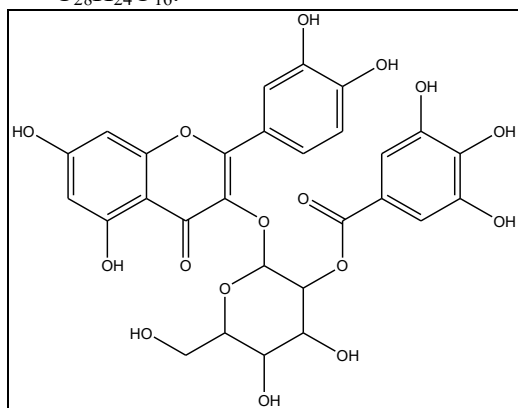
N o	Fraksi	Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi	Persamaan Regresi	IC50 (ppm)
1	E.4.1.1	1,9	43,22	$Y=17,18ln(x)+32,23$	2,82
		3,8	56,78		
		7,6	63,56		
		15,2	80,51		
2	E.4.1.2	0,7	55,93	$Y=5,751n(x)+57,73$	0,21
		1,4	59,32		
		2,8	63,56		
		5,6	67,80		
3	E.4.1.3	1,48	68,64	$Y=4,391n(x)+66,61$	0,02
		2,45	71,19		
		5,9	73,73		
		11,8	77,97		
4	Allupurinol	1	55,08	$Y=6,071n(x)+54,68$	0,46
		2,5	59,32		
		5	64,41		
		10	69,49		

g. Identifikasi struktur kimia fraksi E.4.1.3

Setelah diketahui fraksi E.4.1.3. mempunyai aktivitas penghambatan lebih tinggi dilakukan analisa dengan Kromatografi Cair MS (LC-MS) untuk mengetahui pola kromatogram. Kromatogram LC-MS menunjukkan hubungan waktu retensi (R_t) dengan % kelimpahan. Setiap puncak yang muncul pada R_t tertentu merupakan 1 senyawa. Kromatogram LC-MS E.4.1.3 masih menunjukkan campuran senyawa , karena munculnya 2 puncak. Senyawa dengan % kelimpahan yang cukup tinggi muncul pada R_t 5.00, menit, puncak tersebut kemudian diamati pola pemisahan spektrum MS-nya.

Spektrum LC-MS menunjukkan hubungan antara nilai massa per muatan (m/z) dan % kelimpahan. Spektrum LC-MS isolat E.4.1.3 pada R_t 5.5 menit menunjukkan bobot molekul (BM) 617 g/mol paling tinggi (puncak dasar). Selanjutnya dicari kemiripan pola fragmentasi dan m/z berdasar pustaka yang ada, dan disimpulkan senyawa tersebut diduga senyawa Quercetin 3-(2-

galloylglucoside) dengan molekul $C_{28}H_{24}O_{16}$.



Gambar 1. Struktur Quercetin 3-(2-galloylglucoside)

Dugaan ini diperkuat dengan membandingkan spektra MS standar dari Quercetin 3-(2-galloylglucoside).

h. Permeriksaan zat aktif dengan FT-IR spektrofotometer

Selain dilakukan analisa secara LC-MS juga dilakukan pemeriksaan FT-IR Spectrofotometer untuk mendapatkan data pendukung berupa gugus fungsi yang ada pada fraksi E.4.1.3. Analisis gugus fungsi menggunakan instrumen FTIR, spektrum FTIR menunjukkan hubungan antara nilai bilangan gelombang dan intensitas transmitansnya. Isolat 4.1,3 memunculkan serapan pada bilangan gelombang 3430.55, 2922.28, 1699.36, 1624.13 dan 1098.51 cm^{-1} .

4. Kesimpulan

Identifikasi isolat Fraksi E.4.1.3 murni senyawa 1 dengan metode FT-IR, dan LC-ESI-MS menghasilkan rangkuman informasi yang menunjukkan bahwa isolat merupakan Quercetin 3-(2-galloylglucoside).

5. Daftar Pustaka

- [1] Chang FR, Liaw CC, Lin CY, Chou CJ, Chiu HF, Wu YC. New adjacent bistetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Planta Med* 69: 2003, p. 241 - 46.
- [2] Teyler, Leslie. 2002. *Herbal Secrets of The Rainforest*.

- [3] Gleye, Christophe, et all. 1996. *Cohibins A and B, Acetogenins From Roots of Annona Muricata*. Universite Paris XI. Page 2
- [4] Kintzios, S.E and Maria G.B.,2010, *Plants That Fight Cancer*
- [5] Luciana, A.R. 2010. *Acetogenins from Annonacornifolia and their antioxidant capacity*. Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais. MG, Brazil. Page 2.