

EKSTRAKSI ANTIOKSIDAN DAUN SIRSAK METODE *ULTRASONIC BATH* (KAJIAN RASIO BAHAN : PELARUT DAN LAMA EKSTRAKSI)

Antioxidant Extraction of Soursop Leaf with Ultrasonic Bath (Study of Material: Solvent Ratio and Extraction Time)

Hana Handayani¹, Feronika Heppy Sriherfyna¹, Yunianta¹

1) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP Universitas Brawijaya, Malang
Jl. Veteran, Malang 65145

*Penulis Korespondensi, Email: hana_handayani18@yahoo.com

ABSTRAK

Daun sirsak salah satu yang banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Senyawa bioaktif dan antioksidan seperti tannin, flavonoid, polifenol, *Annonaceuous acetogenius*, dan saponin banyak terdapat pada daun sirsak. Senyawa-senyawa tersebut memiliki kemampuan sitotoksik yang dapat menghambat dan mereduksi radikal bebas. Ekstraksi konvensional umumnya memakan waktu yang lama dan melibatkan proses termal yang dapat merusak senyawa antioksidan, sehingga diperlukan metode yang lebih efisien salah satunya menggunakan metode ultrasonik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh rasio bahan : pelarut dan lama ekstraksi menggunakan metode ultrasonik sehingga dihasilkan ekstrak daun sirsak terbaik. Penelitian ini disusun menggunakan metode Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 2 faktor yaitu rasio bahan : pelarut (1:5, 1:10, 1:15) dan lama ekstraksi (10, 15, 20 menit). Perlakuan terbaik diperoleh dari rasio bahan : pelarut 1:10 (b/v) dan lama ekstraksi 20 menit dengan rendemen 11.72%, kandungan total fenol 15213.33 ppm, kadar flavonoid 45843 ppm, aktivitas antioksidan 78.14% dan nilai IC_{50} 15.58 ppm.

Kata kunci: Antioksidan, Daun Sirsak, Ultrasonik

ABSTRACT

Soursop leaf is one of its parts that frequently used as a traditional medicine. Bioactive and antioxidants compounds such as tannins, flavonoids, polyphenols, Annonaceuous acetogenius, and saponins are richly found in soursop leaves. These compounds have the ability to inhibit the cytotoxic and reduce off free radical. Conventional extraction generally takes a long time and involves a thermal process. Ultrasonic is one of the efficient method to extract a antioxidant compounds. The research arranged using Randomized Block Design with 2 factors which is the ratio of material : solvent (1:5, 1:10, 1:15) and extraction time (10, 15, 20 minutes). The best treatment was obtained from 1:10 (b/v) ratio of material : solvent and 20 minutes time extraction with a yield values of 11.72%, total phenol values of 15213.33 ppm, 45843 ppm levels of flavonoids, antioxidant activity 78.14%, and the IC_{50} values of 15.58 ppm.

Keywords: Antioxidant, Soursop Leaf, Ultrasonic

PENDAHULUAN

Sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan salah satu jenis tanaman buah yang berasal dari dataran Amerika Selatan yang beriklim tropis. Nama latin sirsak yaitu *Annona muricata* L. dengan arti *Annona* merupakan genus dari pohon buah-buahan tropis yang termasuk

keluarga *Annonaceae* yang memiliki 119 spesies lainnya [1]. Bagian tanaman sirsak yang memiliki jumlah besar dalam satu pohon adalah daunnya. Dewasa saat ini banyak penelitian pengembangan tentang daun sirsak, daun sirsak memiliki banyak manfaat dan telah diaplikasikan sebagai obat tradisional, suplemen herbal, dan olahan pangan seperti *jellydrink* dan teh. Manfaat yang dapat diambil dari daun sirsak yaitu memiliki efek sedatif, antispasmodic, hipotensif, antioksidan, dan antitumor [2].

Senyawa bioaktif seperti tanin, flavonoid, polifenol, *Annonaceous acetogenin*, dan saponin banyak terdapat pada daun sirsak. Senyawa-senyawa tersebut terutama *Annonaceous acetogenin* memiliki kemampuan sitotoksik yang dapat menghambat dan menghentikan pertumbuhan sel kanker [3]. Senyawa yang terdapat dalam daun sirsak merupakan senyawa yang tidak tahan panas dan pada suhu $>60^{\circ}\text{C}$ dapat mengalami perubahan struktur serta menghasilkan ekstrak yang rendah dengan pelarut organik menggunakan metode ekstraksi konvensional [4].

Pemilihan metode ekstraksi sangat penting dilakukan karena hasil ekstraksi akan mencerminkan tingkat keberhasilan metode tersebut [5]. Metode konvensional memiliki kekurangan karena membutuhkan waktu ekstraksi yang lama, membutuhkan banyak pelarut serta hasil ekstrak yang didapatkan kurang maksimal. Optimasi ekstraksi daun sirsak dapat dilakukan dengan metode ekstraksi ultrasonik. Metode ultrasonik menggunakan gelombang ultrasonik yaitu gelombang akustik dengan frekuensi lebih besar dari 16-20 kHz. Ultrasonik bersifat *non-destructive* dan *non-invasive*, sehingga dapat dengan mudah diadaptasikan ke berbagai aplikasi. Salah satu kelebihan metode ekstraksi ultrasonik adalah untuk mempercepat proses ekstraksi, dibandingkan dengan ekstraksi termal atau ekstraksi konvensional, metode ultrasonik ini lebih aman, lebih singkat, dan meningkatkan jumlah rendemen kasar. Ultrasonik juga dapat menurunkan suhu operasi pada ekstrak yang tidak tahan panas, sehingga cocok untuk diterapkan pada ekstraksi senyawa bioaktif tidak tahan panas [6].

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh perbandingan rasio bahan : pelarut dan lama ekstraksi terhadap kadar antioksidan daun sirsak yang dihasilkan dengan ekstraksi menggunakan gelombang ultrasonik.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan untuk ekstraksi meliputi daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang diperoleh dari Kebun Tridharma Universitas Gadjah Mada Yogyakarta Banguntapan, Bantul dengan karakteristik lebar daun ± 11 cm, berwarna hijau agak tua, berada pada ranting urutan 3 – 5 dari pucuk dan diambil pada pukul 05.00 - 06.00 WIB. Digunakan pelarut Etanol dengan kemurnian teknis 96% untuk ekstraksi dan kemurnian PA untuk analisis, NaNO_2 , AlCl_3 , NaOH , reagen Folin Ciocalteu, Na_2CO_3 , dan Aquades didapatkan dari Toko Makmur Sejati dan Kridatama. DPPH 0.2 mM dalam etanol didapatkan dari Laboratorium Biokimia dan Analisis Pangan Universitas Brawijaya.

Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan serbuk daun sirsak meliputi loyang, ayakan 80 mesh, blender kering (Panasonic), termometer, sendok, baskom, dan plastik.

Alat yang digunakan dalam ekstraksi senyawa antioksidan meliputi neraca analitik (Denver Instrument M-310), alat ekstraksi ultrasonik *bath* (Elmer), *beaker glass* (Pyrex), corong kaca (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), spatula, *vacuum rotary evaporator* (Buchi B-490), botol sampel, corong plastik, pipet tetes dan *freezer* (Gea AB-396-T-X).

Alat yang digunakan dalam analisis ekstrak antioksidan meliputi *glassware* (Pyrex), desikator, bola hisap, tabung reaksi (Pyrex), pipet volume (Pyrex), labu ukur (Pyrex), corong kaca (Pyrex), oven listrik (Mettler U.30), spektrofotometer dan kuvet (Unico UV-2100), *Vortex mixer* (LW Scientific), dan rak tabung reaksi.

Desain Penelitian

Penelitian disusun menggunakan metode Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 2 faktor yaitu rasio bahan:pelarut (1:5, 1:10, 1:15) dan lama ekstraksi (10, 15, 20 menit). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 27 satuan percobaan. Data dianalisis dengan menggunakan metode analisis ragam (*Analysis of Variant* atau ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji lanjut BNT atau DMRT dengan selang kepercayaan 5% dan 1%. Pemilihan perlakuan terbaik dilakukan dengan metode Zeleny [7].

Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian dilakukan dengan dua tahapan yaitu pembuatan serbuk daun sirsak dan pembuatan ekstrak antioksidan dari daun sirsak menggunakan gelombang ultrasonik.

Metode

Analisis bahan bakuserbuk daun sirsak meliputi analisis kadar air [8], kadar flavonoid [9], total fenol [10], dan aktivitas antioksidan IC₅₀ [11]. Analisis ekstrak daun sirsak meliputi total rendemen [12], kadar flavonoid [9], total fenol [10], dan aktivitas antioksidan IC₅₀ [11]. Perlakuan terbaik dicari dengan menggunakan metode Zeleny [7].

Prosedur Analisis

1. Analisis Kadar Air

Cawan petri dimasukkan ke dalam oven (105°C) selama 24 jam setelah itu dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit kemudian ditimbang. Sampel yang telah dihaluskan ditimbang 2 gram dalam wadah yang telah diketahui berat konstannya kemudian dioven pada suhu 100°C-105°C selama 5 jam. Setelah itu didinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang beratnya. Lalu dipanaskan lagi dalam oven 30 menit kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Perlakuan ini diulang sampai tercapai berat konstan.

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{\text{berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

2. Analisis Rendemen

Ekstrak pekat hasil evaporasi yang dihasilkan, ditimbang dalam wadah yang telah diketahui beratnya kemudian berat ekstrak pekat dibandingkan dengan berat awal bubuk.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat akhir sampel}}{\text{berat awal sampel}} \times 100\%$$

3. Analisis Kadar Flavonoid

Sampel diencerkan pada konsentrasi 5000 ppm kemudian diambil 1 ml ditambahkan 4 ml aquades, 0.3 ml NaNO₂ 5% kemudian divortex dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 0.3 ml AlCl₃ 10%, 2 ml NaOH 1 M, dan 2.4 ml aquades kemudian divortex dan dibiarkan 5 menit lalu diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang 417 nm. Total flavonoid diukur menggunakan kurva standar dengan quercetin (0-50 mg/l) sebagai standar.

4. Analisis Total Fenol

Sampel yang sudah diencerkan pada konsentrasi 1000 ppm kemudian ditambahkan 0.1 ml reagen Folin Ciocalteau dan 2 ml larutan Na₂CO₃ 2% kemudian di vortex dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Sampel kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 750 nm. Total fenol diukur menggunakan kurva standar dengan asam galat sebagai standar.

5. Analisis Aktivitas Antioksidan

Sampel diencerkan menggunakan etanol 96% pada konsentrasi 100, 200, 300 dan 400 ppm dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sampel yang telah diatur konsentrasinya kemudian ditambahkan 1.1-diphenil-2-picryllhydrazil (DPPH) 0.2 mM sebanyak 1 ml dan didiamkan selama 30 menit. Setelah 30 menit, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm setelah diukur absorbansi blanko. Blanko dibuat dengan cara membuat larutan 4 ml etanol 96% dengan 1 ml larutan 1.1-diphenil-2-picryllhydrazil (DPPH) 0.2 mM. Aktivitas *scavenging* terhadap radikal DPPH dinyatakan sebagai % penghambatan terhadap radikal DPPH. Persen penghambatan dihitung sesuai rumus : $[(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$, A_0 = absorbansi tanpa penambahan sampel/standar

Persen penghambatan masing-masing konsentrasi sampel diplot masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan segresi linear. Persamaan regresi linear yang diperoleh dalam bentuk persamaan $y = a + bx$ digunakan untuk mencari nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration* 50%) dari masing-masing sampel dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai IC_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Karakteristik Bahan Baku

Data analisis karakteristik bahan baku berupa serbuk daun sirsak dapat dilihat pada Tabel 1. Tabel 1 menunjukkan bahwa hasil analisis memiliki sedikit perbedaan dengan literatur yang didapatkan. Perbedaan tersebut dimungkinkan karena suhu dan waktu yang digunakan saat proses pengeringan, metode pengeringan, dan metode analisis yang dilakukan berbeda. Adanya perbedaan perlakuan pendahuluan bahan sebelum bahan diuji dan perbedaan jenis bahan baku yang digunakan juga dimungkinkan mempengaruhi kandungan kimia suatu bahan. Adanya perbedaan hasil analisa dapat disebabkan oleh beberapa alasan, diantaranya perbedaan asal bahan baku, varietas bahan baku, metode pengeringan yang digunakan, tempat tumbuh, iklim, kondisi lingkungan, dan cara budidaya yang berbeda sehingga standart bahan baku yang digunakan juga berbeda. Faktor yang mempengaruhi kadar antioksidan di dalam daun sirsak antara lain jenis pohon sirsak, tempat tumbuh, bagian daun yang diambil, dan perlakuan yang diberikan [13].

Tabel 1. Data Analisis Bahan Baku

Parameter	Serbuk Daun Sirsak Kering	
	Hasil Analisa	Literatur ^a
Rendemen (%)	55	46
Kadar air (%)	6.3	5.9
Total fenol (ppm)	171.35	165.32
Kadar flavonoid (ppm)	17327	+*
Aktivitas antioksidan (%)	42.92	43.77
IC_{50} (ppm)	37.71	38.32

Keterangan: ^a[15]

* Positif dalam uji flavonoid

2. Rendemen Ekstrak Daun Sirsak

Hasil analisis total rendemen ekstrak daun sirsak dengan metode ultrasonik akibat perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 2. dan Tabel 3. Perlakuan rasio bahan:pelarut memberikan perbedaan nyata pada rasio bahan : pelarut 1:5 dan 1:15 dan lama ekstraksi tidak memberikan pengaruh nyata terhadap total rendemen ekstrak daun sirsak yang dihasilkan.

Tabel 2. Rerata Total Rendemen Ekstrak Daun Sirsak Akibat Pengaruh Rasio Bahan : Pelarut

Rasio Bahan : Pelarut (b/v)	Rerata Rendemen (%)	BNT 0,05
1 : 5	9.63 a	
1 : 10	11.89 a	2.49
1 : 15	15.78 b	

Keterangan : Nilai yang didampingi huruf yang berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha=0.05$

Berdasarkan Tabel 2 diketahui perbedaan rendemen yang memiliki pengaruh nyata terdapat pada sampel dengan perlakuan rasio bahan : pelarut 1:5 dan 1:15. Diduga semakin banyak rasio pelarut etanol yang ditambahkan maka tekanan yang diberikan semakin besar sehingga proses plasmolisis terjadi semakin besar pula dan menyebabkan cairan sel yang keluar juga semakin banyak. Jika jumlah pelarut etanol yang ditambahkan semakin banyak maka kontak bahan dengan etanol yang berfungsi sebagai media ekstraksi juga lebih besar sehingga berpotensi memaksimalkan hasil rendemen ekstrak [14].

Tabel 3. Rerata Total Rendemen Ekstrak Daun Sirsak Akibat Lama Ekstraksi

Lama Ekstraksi	Rerata Rendemen (%)	BNT 0,05
10 menit	12.21	
15 menit	12.37	2.49
20 menit	12.72	

Keterangan : Nilai yang didampingi huruf yang berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha=0.05$

Berdasarkan Tabel 3 dapat diketahui bahwa perlakuan lama ekstraksi tidak berpengaruh nyata terhadap rendemen ekstrak daun sirsak yang dihasilkan jika dibandingkan dengan nilai BNT. Diduga rentang waktu yang diberikan tidak menyebabkan perbedaan rendemen yang terlalu signifikan karena variasi waktu yang digunakan tidak memiliki rentang yang jauh sehingga tidak berpengaruh pada total rendemen yang dihasilkan. Semakin lama waktu ekstraksi, kesempatan bahan untuk kontak dengan pelarut semakin besar sehingga hasilnya juga akan bertambah sampai titik jenuh larutan. Berdasarkan hal tersebut hasil analisa rendemen berdasarkan faktor lama ekstraksi sesuai dengan literatur yaitu nilai rerata rendemen dengan penambahan lama ekstraksi meningkat, walaupun setiap peningkatan rerata rendemen tidak berbeda nyata [15].

3. Total Fenol Ekstrak Daun Sirsak

Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa perlakuan rasio bahan : pelarut dan lama ekstraksi memberikan pengaruh nyata ($\alpha=0.05$) terhadap kadar total fenol ekstrak daun sirsak namun tidak terjadi interaksi antara kedua perlakuan yang diberikan tersebut. Rerata total fenol ekstrak daun sirsak akibat perlakuan rasio bahan : pelarut disajikan dalam Tabel 4. Rerata total fenol ekstrak daun sirsak akibat perlakuan lama ekstraksi disajikan dalam Tabel 5.

Berdasarkan Tabel 4 terlihat bahwa semakin tinggi rasio bahan:pelarut menyebabkan rerata total fenol semakin tinggi dan terdapat pengaruh yang nyata antar parameter. Semakin banyak pelarut yang ditambahkan maka semakin besar kemampuan pelarut untuk melarutkan bahan sehingga semakin banyak komponen bahan yang dapat terekstrak oleh pelarut. Komponen bahan yang terekstrak akan terus meningkat hingga larutan menjadi jenuh, setelah melewati titik jenuh larutan, tidak akan terjadi peningkatan hasil ekstraksi dengan penambahan pelarut [15].

Tabel 4. Rerata Total Fenol Ekstrak Daun Sirsak Akibat Perbedaan Rasio Bahan :Pelarut

Rasio Bahan : Pelarut (b/v)	Rerata Total Fenol (ppm)	BNT 0,05
1 : 5	12424.44 a	
1 : 10	14589.52 b	464.5
1 : 15	15521.27 c	

Keterangan : Nilai yang didampingi huruf yang berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha=0.05$

Tabel 5. Rerata Total Fenol Ekstrak Daun Sirsak Akibat Lama Ekstraksi

Lama Ekstraksi	Rerata Total Fenol (ppm)	BNT 0,05
10 menit	13491.11 a	
15 menit	14216.50 b	464.5
20 menit	14527.62 b	

Keterangan : Nilai yang didampingi huruf yang berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha=0.05$

Hasil analisa ragam kandungan total fenol ekstrak daun sirsak akibat pengaruh lama ekstraksi menunjukkan tidak adanya perbedaan nyata pada total fenol yang dihasilkan pada menit ke 15 dan menit ke 20, diduga larutan sudah memasuki titik jenuh sehingga tidak dapat menghasilkan ekstrak lebih banyak lagi. Salah satu faktor yang mempengaruhi hal ini adalah proses kavitasasi pada ekstraksi metode ultrasonik. Saat temperatur meningkat, terjadi peningkatan jumlah gelembung dalam cairan namun intensitas dari pemecahan atau terjadinya kavitasasi tereduksi karena tekanan uap sehingga kavitasasi yang terjadi semakin menurun [16].

4. Kadar Flavonoid Ekstrak Daun Sirsak

Hasil analisis rerata kadar flavonoid ekstrak daun sirsak dengan gelombang ultrasonik akibat perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 6 dan Tabel 7.

Tabel 6. Rerata Kadar Flavonoid Ekstrak Daun Sirsak Akibat Perbedaan Rasio Bahan : Pelarut

Rasio Bahan : Pelarut (b/v)	Rerata Kadar Flavonoid (ppm)	BNT 0,05
1 : 5	39582.22 a	
1 : 10	44437.78 b	1034.24
1 : 15	45047.89 b	

Keterangan : Nilai yang didampingi huruf yang berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha=0.05$

Hasil analisa ragam menunjukkan tidak adanya perbedaan nyata kadar flavonoid pada sampel dengan penambahan bahan : pelarut 1:10 dan 1:15. Diduga penambahan pelarut dengan rasio bahan : pelarut 1:15 menyebabkan sampel berada pada titik jenuh. Penggunaan volume pelarut berlebih mengakibatkan penurunan kadar senyawa yang diinginkan. Hal ini disebabkan karena pelarut menyerap energi dari gelombang ultrasonik terlebih dahulu sebelum masuk ke dalam matriks bahan, maka ketika masuk ke dalam

matrik bahan energi gelombang ultrasonik berkurang sehingga ekstraksi berjalan kurang optimal [17].

Tabel 7. Rerata Kadar Flavonoid Ekstrak Daun Sirsak Akibat Lama Ekstraksi

Lama Ekstraksi	Rerata Total Flavonoid (ppm)	BNT 0,05
10 menit	42910 ab	
15 menit	42421.11 a	1034.24
20 menit	43736.77 b	

Keterangan : Nilai yang didampingi huruf yang berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha=0.05$

Hasil analisa ragam ($\alpha=0.05$) menunjukkan bahwa perbedaan nyata baru terlihat pada pada ekstraksi selama 10 menit dan ekstraksi selama 20 menit. Dapat dikatakan ekstraksi selama 15 menit tidak memberikan pengaruh nyata pada hasil analisa kadar flavonoid secara signifikan. Senyawa flavonoid yang terekstrak semakin meningkat karena semakin lama waktu ekstraksi maka kontak antara bahan dan pelarut akan lebih lama sehingga senyawa flavonoid yang dihasilkan dari ekstraksi daun sirsak akan semakin meningkat walaupun kenaikan kadar flavonoid tidak berpengaruh sangat nyata. Waktu ekstraksi berbanding lurus dengan hasil ekstraksi dan jumlah rendemen yang dihasilkan pada proses ekstraksi akan mempengaruhi kadar flavonoid yang dihasilkan. Semakin tinggi rendemen yang dihasilkan maka kemungkinan senyawa biaktif yang dihasilkan juga akan semakin tinggi [18].

5. Aktivitas Antioksidan dan Nilai IC₅₀ Ekstrak Daun Sirsak

Perbedaan rasio bahan : pelarut dan lama ekstraksi memberikan pengaruh yang sangat nyata ($\alpha=0.01$) terhadap aktivitas antioksidan (% inhibisi) dan nilai IC₅₀ ekstrak daun sirsak, namun interaksi antara kedua perlakuan tersebut tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun sirsak. Rerata aktivitas antioksidan ekstrak daun sirsak akibat rasio bahan : pelarut dapat dilihat pada Tabel 8 dan Tabel 9.

Tabel 8. Rerata Persen Inhibisi Ekstrak Daun Sirsak Akibat Perbedaan Rasio Bahan : Pelarut

Rasio Bahan : Pelarut	Rerata Persen Inhibisi (%)	BNT 0,05
1 : 5	56.39 a	
1 : 10	74.55 b	2.89
1 : 15	82.16 c	

Keterangan : Nilai yang didampingi huruf yang berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha=0.05$

Tabel 9. Rerata Aktivitas Antioksidan Metode IC₅₀ Ekstrak Daun Sirsak Akibat Perbedaan Rasio Bahan : Pelarut

Rasio Bahan : Pelarut	Rerata Aktivitas Antioksidan (ppm)	BNT 0,05
1 : 5	21.64 c	
1 : 10	17.31 b	0.74
1 : 15	12.27 a	

Keterangan : Nilai yang didampingi huruf yang berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha=0.05$

Berdasarkan Tabel 8 dan Tabel 9, aktivitas antioksidan yang dihitung berdasarkan persen inhibisi memiliki tren yang terus meningkat. Rerata aktivitas antioksidan dengan metode IC₅₀ memiliki tren yang semakin menurun dengan nilai terbesar 21.64 ppm dan terendah 12.27 ppm. Kedua parameter ini menghasilkan nilai yang berlawanan arah, karena nilai inhibisi merupakan nilai penghambatan radikal bebas, sedangkan IC₅₀ atau *Inhibition Concentration* 50% menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%. Semakin rendah nilai absorbansi sampel, semakin tinggi aktivitas antioksidan yang dimiliki ekstrak daun sirsak [1].

Tabel 10. Rerata Persen Inhibisi Ekstrak Daun Sirsak Akibat Lama Ekstraksi

Lama Ekstraksi	Rerata Persen Inhibisi (%)	BNT 0,05
10 menit	64.37 a	
15 menit	73.25 ab	2.89
20 menit	75.46 b	

Keterangan : Nilai yang didampingi huruf yang berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha=0.05$

Tabel 11. Rerata Aktivitas Antioksidan Metode IC₅₀ Ekstrak Daun Sirsak Akibat Lama Ekstraksi

Lama Ekstraksi	Rerata Aktivitas Antioksidan (ppm)	BNT 0,05
10 menit	18.82 c	
15 menit	16.72 b	0.74
20 menit	15.62 a	

Keterangan : Nilai yang didampingi huruf yang berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha=0.05$

Berdasarkan Tabel 10 dan Tabel 11 dapat diketahui bahwa nilai persen inhibisi terus meningkat dan nilai aktivitas antioksidan terus menurun sejalan dengan penambahan waktu. Hasil analisa ragam ($\alpha=0.05$) menunjukkan nilai persen inhibisi berbeda nyata hanya pada menit ke 10 dan menit ke 20, tetapi hasil nilai IC₅₀ terus menurun dan menunjukkan adanya perbedaan nyata antar parameter yang diberikan. Diduga adanya panas dari sistem ultrasonik akan mempengaruhi nilai persen inhibisi. Panas yang berlebihan menyebabkan suhu ekstraksi mencapai titik labil senyawa target dan mengakibatkan rusaknya senyawa target secara termal, sehingga dimungkinkan terjadinya peningkatan konsentrasi ekstrak yang tidak terlalu tajam, bahkan penurunan hasil ekstrak hingga bahan tidak dapat terekstrak lagi [19]. Aktivitas antioksidan pada ekstrak daun sirsak dipengaruhi oleh kadar total fenol dan flavonoid yang dikandung oleh ekstrak daun sirsak. Aktivitas antioksidan yang dihitung dengan persen inhibisi akan semakin meningkat dengan meningkatnya kadar total fenol dan kadar flavonoid ekstrak daun sirsak, begitu pula sebaliknya nilai persen inhibisi ekstrak daun sirsak akan semakin menurun apabila kadar total fenol dan flavonoid menurun.

6. Pengaruh Total Fenol dan Kadar Flavonoid terhadap Aktivitas Antioksidan (IC₅₀)

Dilakukan uji regresi *multivariate* menggunakan uji korelasi *Pearson* untuk melihat bagaimana pengaruh senyawa bioaktif seperti total fenol dan flavonoid terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun sirsak. Hasil uji korelasi *Pearson* untuk semua perlakuan ekstrak daun sirsak secara umum dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Regresi *Multivariate* Senyawa Bioaktif berupa Total Fenol dan Flavonoid Terhadap Aktivitas Antioksidan (IC₅₀)

Parameter	Nilai
R	0.95
R ²	0.90
Adjusted R ²	0.86
F hitung	2.72
Koefisien Regresi:	
- Konstan	58.42
- Fenol	-1.6 x 10 ⁻³
- Flavonoid	-2.6 x 10 ⁻⁶

Nilai R regresi *multivariate* antara total fenol dan kadar flavonoid terhadap aktivitas antioksidan sebesar 0.95, yang berarti bahwa variabel independen (total fenol dan kadar flavonoid) mempunyai korelasi yang sangat kuat dengan variabel dependen (aktivitas antioksidan) karena nilai R mendekati 1. Nilai *adjusted R²* dari regresi *multivariate* bernilai 0.86 atau 86% dimana hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan (variabel dependen) pada penelitian ini 86% dipengaruhi oleh total fenol dan kadar flavonoid (variabel independen), sementara sebanyak 14% (100-86%) dipengaruhi oleh faktor lain. Selanjutnya dari tabel hasil uji *Pearson* diperoleh koefisien regresi dari semua variabel yang berupa total fenol dan total flavonoid dan dilakukan uji korelasi antara total fenol, flavonoid terhadap aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Tabel 13. Berikut adalah persamaan regresi linier yang diperoleh:

$$y = 58.42 - (1.6 \times 10^{-3})X1 - (-2.6 \times 10^{-6})X2 \quad R = 0.95$$

Keterangan:

y= Nilai aktivitas Antioksidan (ppm)

X1= Total Fenol (ppm)

X2= Kadar Flavonoid (ppm)

Tabel 13. Korelasi Senyawa Bioaktif berupa Total fenol dan Flavonoid Terhadap Aktivitas Antioksidan (IC₅₀)

	Total Fenol	Kadar Flavonoid	Aktivitas Antioksidan
Total Fenol	1		
Kadar Flavonoid	0.92	1	
Aktivitas Antioksidan	-0.93	-0.86	1

Berdasarkan persamaan regresi *multivariate* dan analisa korelasi dapat diasumsikan bahwa senyawa bioaktif yang paling berpengaruh terhadap nilai aktivitas antioksidan (IC₅₀) adalah total fenol karena nilai yang didapat dari persamaan regresi (1.6 x 10⁻³) lebih besar daripada nilai regresi kadar flavonoid (2.6 x 10⁻⁶) dan juga nilai korelasi total fenol terhadap aktivitas antioksidan (IC₅₀) yang lebih besar (93%) dibanding hasil korelasi kadar flavonoid terhadap aktivitas antioksidan (86%). Efek bioaktif senyawa antioksidan terutama disebabkan karena adanya senyawa fenol seperti asam fenolat. Biasanya senyawa-senyawa yang memiliki efek bioaktif adalah senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitui pada posisi ortho dan para terhadap gugus -OH dan -OR [20].

7. Perlakuan Terbaik

Penentuan perlakuan terbaik menggunakan metode *multiple attribute* [7]. Parameter yang digunakan adalah rendemen, total fenol, kadar flavonoid, aktivitas antioksidan, dan IC_{50} . Parameter yang diharapkan memiliki nilai ideal maksimal adalah rendemen, total fenol, kadar flavonoid, aktivitas antioksidan, sedangkan yang diharapkan memiliki nilai ideal minimal adalah IC_{50} . Perlakuan terbaik berdasarkan parameter yang sudah dijelaskan diperoleh pada perlakuan dengan rasio bahan : pelarut sebesar 1 : 10 (b/v) dan lama ekstraksi 20 menit (C2T3). Parameter pada ekstrak daun sirsak hasil perlakuan terbaik dibandingkan dengan serbuk daun sirsak yang sudah dianalisa pada awal penelitian. Nilai parameter uji pada perlakuan terbaik dan serbuk daun sirsak dapat dilihat pada Tabel 14.

Tabel 14. Komposisi Ekstrak Daun Sirsak Perlakuan Terbaik

Parameter	Serbuk Daun Ekstrak Daun Sirsak	
	Hasil Analisa	Perlakuan Terbaik
Rendemen (%)	55	11.72
Total fenol (ppm)	171,35	15213.33
Kadar flavonoid (ppm)	1732750	45843
Aktivitas antioksidan (%)	42.92	78.14
IC_{50} (ppm)	37.71	15.58

Dari Tabel 14 dapat terlihat bahwa ekstrak daun sirsak hasil perlakuan terbaik memiliki nilai parameter yang lebih baik dibandingkan serbuk daun sirsak tanpa perlakuan ekstraksi. Hal ini membuktikan bahwa teknik ekstraksi ultrasonik dapat digunakan sebagai alternatif yang lebih efisien dan cepat dalam mengekstrak senyawa antioksidan dari bahan alami. Keuntungan metode ultrasonik adalah untuk mempercepat proses ekstraksi dan memperbesar hasil ekstraksi [21].

SIMPULAN

Perlakuan terbaik diperoleh dari rasio bahan : pelarut 1:10 (b/v) dan lama ekstraksi 20 menit dengan rendemen 11.72%, kandungan total fenol 15213.33 ppm, kadar flavonoid 45843 ppm, aktivitas antioksidan 78.14% dan nilai IC_{50} 15.58 ppm. Rasio bahan : pelarut memberikan pengaruh nyata ($\alpha=0,05$) terhadap kandungan total fenol, aktivitas antioksidan, dan nilai IC_{50} . Parameter perbedaan lama ekstraksi memberikan pengaruh nyata ($\alpha=0.05$) terhadap kandungan total fenol, aktivitas antioksidan, dan nilai IC_{50} ekstrak daun sirsak. Hasil uji *multivariate* dan analisa korelasi secara keseluruhan untuk semua perlakuan menunjukkan adanya hubungan yang sangat kuat antara variabel independen (total fenol dan kadar flavonoid) terhadap variabel dependen [aktivitas antioksidan (IC_{50})].

DAFTAR PUSTAKA

- 1) Badrie N and Alexander G. 2009. Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, Nutrition Value, Medicinal Uses, and Toxicology. Academic Press. Oxford
- 2) Ahalya, BKR and P. Priyabandhavi. 2013. Evaluation of In Vitro Antioxidant Activity of *Annona muricata* Bark. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences* 3:2, 406-410
- 3) Rachmani, E. 2012. Cytotoxic Effects of Methanol Extracts of Soursop Leaves (*Annona muricata*) on MCF-7 Cell Line and its Effect on Expression of bel-2. Thesis. Jendral Soedirman University. Purwokerto
- 4) Haijun Y, Zhang N, Zeng Q, Yu Q, Ke S, and Li X. 2010. HPLC Method for Simultaneous Determination of Ten *Annonaceous Acetogenins* after Supercritical Fluid CO_2 Extraction. *International Journal of Biomedical Science* 6:3, 202-7

- 5) Abubecker, M.N. and T. Deepalakshami. 2013. In Vitro Antifungal Potentials of Bioactive Compound Methyl Ester of Hexadecanonic Acid Isolated from *Annona muricata* Linn. Leaves. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 10:2, 879-884
- 6) Zou TB, En-Qin Xia, Tai-Ping He, Ming-Yuan Huang, Qing Jia, and Hua-Wen Li. 2014. Ultrasound-Assisted Extraction of Manganiferin from Mango Leaves Using Response Surface Methodology. *Molecules* 19, 1411-1421
- 7) Zeleny, M. 1982. Multiple Criteria Decision Making. Mc Graw Hill. New York
- 8) AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. Association of Official Analysis Chemistry. Washington
- 9) Hui, L.Q. 2009. Total Phenolic Content and Total Flavonoid of *H. polyrhizus* Waste Extract by Using Ultrasonic Solvents Extraction. Faculty of Chemical Engineering and Natural Resources. Project Paper. Universiti Malaysia Pahang. Malaysia
- 10) Huang D., Ou B, and Prior R.L. 2005. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. *J. of Agricultural and Food Chemistry* 53:6, 1841-1856
- 11) Prasetya, Galih H., dan Hendrawan L. 2013. Ekstraksi Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) menggunakan Pelarut Etanol. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, 2:2, 111-115
- 12) Supriadi. 2002. Optimalisasi Ekstraksi Komponen Bioaktif Daun Tabat Barito (*Ficus deltoidea*). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- 13) Zuhud, A.M. 2011. Bukti Kedahsyatan Sirsak Menumpas Kanker. PT Agromedia Pusataka. Jakarta
- 14) Anam, C. 2010. Ekstraksi Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale*) Kajian dari Ukuran Bahan, Pelarut, Waktu dan Suhu. *Jurnal Pertanian MAPETA* 2, 72-144
- 15) Siregar, E.D.M. 2005. Perlakuan Jenis Pakan Alami pada Daun Sirsak dan Teh. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- 16) Brennan, J.G. 2006. Food Processing Handbook. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA Weinheim. Germany
- 17) Wang, L. and Wang, Y. 2004. Application of High Intensity Ultrasound and Surfactans in Rice Starch Isolation. *Journal Food Science University of Arkansas* 81:1, 140-144
- 18) Ketaren, S. 1986. Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Makan. UI Press. Jakarta
- 19) Darwis, D. 2000. Teknik Dasar Laboratorium dalam Penelitian Senyawa Bahan Alam. FMIPA Universitas andalas. Padang
- 20) Patel R, Yogesh P, Prasant K, and AnjuKunjadia. 2015. DPPH Free Radical Scavenging Activity of Phenolics and Flavonoids in some Medicinal Plants of India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 1:1, 773-780
- 21) Manasika, A. 2013. Ekstraksi Pigmen Karotenoid Labu Kabocha Menggunakan Metode Ultrasonik (Kajian Rasio Bahan: Pelarut dan Lama Ekstraksi). <http://jpa.ub.ac.id/index.php/jpa/article/view/215/222>. Tanggal akses: 10/02/2015