

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN INFUSA DAUN SRIKAYA (*Annona squamosa*, L)

Oleh :

Isnaini Zuliastuti Mubarakah, Nurfina Aznam, & Laela Hayu Nurani
Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

Abstrak

Aktivitas sebagai antioksidan yang dimiliki oleh sebagian besar flavonoid telah diteliti. Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa pemisahan flavonoid dalam fraksi eter hasil hidrolisis infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L) dengan metode kromatografi kertas diperoleh hasil pemisahan yang baik dengan fase gerak asam asetat 15 %. Identifikasi flavonoid tersebut menggunakan spektrofotometer UV diperoleh 4 isolat flavonoid (Nurani, 2004). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan flavonoid yang terkandung dalam daun srikaya (*Annona squamosa*, L) sebagai penghambat oksidasi yang berfungsi sebagai antioksidan. Penelitian penghambatan oksidasi dilakukan dengan proses autooksidasi asam linoleat yang menghasilkan TBA-reacting substrate (TBARS) (dianggap sebagai malondialdehida). Malondialdehida ini akan bereaksi dengan asam 2-tiobarbiturat menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah jambu kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimum 532 nm. Berat sampel infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L) serta kuersetin yang digunakan adalah 8 mg. Penghambatan oksidasi dihitung berdasarkan berkurangnya absorbansi tanpa adanya sampel dibanding absorbansi dengan adanya sampel. Persentase penghambatan oksidasi yang dihasilkan menunjukkan bahwa perlakuan antar sampel mampu menghambat oksidasi dengan penghambatan kuersetin ($57,11 \pm 5,47$) % > infusa ($53,23 \pm 2,91$) %. Hasil analisis menggunakan metode analisis varian satu jalan (ANOVA) dengan taraf signifikan 99 % menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna.

Kata kunci : Antioksidan, flavonoid, srikaya

Abstract

The activity as an antioxidant in most of all flavonoids contents have been studied. The study formerly showed that flavonoids extraction in the ether fraction hydrolyzed from Annona squamosa, L infusion by using paper chromatography a good separation were obtained by using acetic acid 15 % as a mobile phase. The identification of the flavonoid using UV spectrophotometer was gotten 4 isolats of flavonoid (Nurani, 2004). This study is done to find out the ability of the flavonoid in the flavonoid infusion from the leaves of Annona squamosa, L as an oxidation inhibitor which has an antioxidationt function. The oxidation inhibition study was held with linoleic acid autooxidation process which obtained TBA-reacting subsrate (TBARS) (considered as molandialdehyde). This molandialdehyde is reacted whit 2-thiobarbituric acid and produce a pink complex compound then the absorbances is identified using the visibel spectrophotometer in 532 nm maximum wave length. The weight of infusion sample from the leaves of Annona squamosa, L and also the quersetin being used was 8 mg. The oxidation inhibition is counted based on the absorbant reduction without sample compared to the absorbant with sample. The oxidation inhibition percentage showed that the treatment among samples is able to inhibit the oxidation with the oxidation inhibition of quersetin ($57,11 \pm 5,47$) % > infusion ($53,23 \pm 2,91$) %. The result of analysis using the ANOVA method with 99 % significant level showed a significant difference among the treatmens.

Key words : Antioxidant, Flavonid, srikaya.

I. PENDAHULUAN

Radikal bebas yang terbentuk di dalam tubuh akibat produk sampingan proses metabolisme ataupun karena terpapar dan terhisapnya radikal bebas melalui pernafasan akan

berkeliraran di seluruh tubuh. Akibat serbuan radikal bebas tersebut otomatis akan mengurangi lamanya hidup, menurunkan kualitas hidup dan mempercepat proses penuaan (Dalimarta dan Soedibyo, 1999).

Sekarang proses penuaan dini sudah dapat dihambat, dikendalikan, bahkan diobati. Usaha-usaha yang dilakukan adalah dengan menggunakan obat modern maupun obat tradisional. Salah satu obat tradisional yang digunakan adalah srikaya (*Annona squamosa*, L). Di Indonesia srikaya (*Annona squamosa*, L) digunakan sebagai salah satu obat tradisional dan ternyata srikaya (*Annona squamosa*, L) memiliki aksi farmakologis yang sangat luas antara lain untuk mempercepat pemasakan bisul (Sudarsono, 2002), obat skabies, insektisida, obat cacing, dan juga sebagai obat anti tumor atau anti neoplastik (Anonim, 1985 ; Heyne, 1987).

Penelitian ini menggunakan infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L). Sebagian besar flavonoid mempunyai aktivitas sebagai antiinflamasi, antitumor, antioksidan (Samuelsson, 1999; Dewick, 1997), antivirus (Geissman, 1962), menghambat siklooksigenase, lipooksigenase, protein kinase, balik transkriptase, DNA polymerase, dan anti hipertensi (Robinson, 1991; Bruneton, 1999).

II. METODE PENELITIAN

II.1. Alat

Alat yang digunakan untuk uji antioksidan terdiri dari spektrofotometer UV-Vis dengan kuvetnya (Shimadzu), labu ukur (Pyrex), pipet volume (Pyrex), propipet (Pyrex), pH meter, gelas ukur (Pyrex), erlenmeyer (Pyrex), rak tabung, pipet tetes, neraca milligram (Metler toledo), termometer, oven, *centrifuge*, tabung reaksi (Pyrex), vial, inkubator, penangas air (Memmert).

II.2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk uji antioksidan dengan metode asam 2-tiobarbiturat terdiri dari etanol absolut, asam linoleat 2,58 % (Sigma), buffer fosfat 0,5 M pH 7, akuadestilata, asam klorida 0,125 N, asam triklorasetat 16,8 % (Merck), asam 2-tiobarbiturat (Aldrich), aluminium foil, kuersetin.

II.3. Cara memperoleh infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L)

Serbuk daun kering seberat 100 gram kemudian dimasukkan dalam panci infusa ditambah 1200 ml air selanjutnya diinfundasi selama 15 menit pada suhu 90°C kemudian diserkai panas dengan menggunakan kain flanel dan dilanjutkan dengan kertas saring menggunakan Buchner dan pengurangan tekanan. Kemudian filtrat diuapkan sampai kering.

II. 4. Uji aktivitas antioksidan

a. Metode asam fosfomolibdat

Infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L) yang diperoleh dan pembanding kuersetin ditotolkan pada kertas Whatman no.1, kemudian dikembangkan menggunakan asam asetat 15 % sebagai fase gerak. Kertas Whatman no.1 yang telah dikembangkan diambil dan dibiarkan mengering. Setelah kering diuapi ammonia dan disemprot dengan asam fosfomolibdat dan dibiarkan mengering, diamati ada tidaknya warna biru abu-abu (warna biru abu-abu menunjukkan adanya antioksidan).

b. Metode asam 2-tiobarbiturat

Ke dalam sebuah vial bertutup ulir (50 ml) dengan diameter 38 mm dan tinggi 75 mm di masukkan campuran sampel (8 mg) dalam 4 ml etanol, lalu ditambahkan 4,1 ml 2,53 % asam linoleat dalam etanol, ditambah 8 ml buffer fosfat 0,5 M (pH 7) dan akuadestilata sebanyak 3,9 ml. Campuran tersebut diinkubasi pada 37°C dalam keadaan gelap. Kemudian campuran di atas diambil sebanyak 0,5 ml dan ditambah pereaksi asam 2-tiobarbiturat (selanjutnya disebut TBA) sebanyak 2 ml. Campuran sampel dan TBA dipanaskan di atas penangas air mendidih selama 10 menit dan setelah dingin disentrifugasi pada 3200 rpm selama 20 menit. Setelah disaring, filtrat dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 532 nm. Sebagai kontrol positif digunakan kuersetin (5,7,3',4' tetrahidroksi flavonol) dan kontrol negatif digunakan pelarut tanpa sampel.

II. 5. Analisis data

Penelitian ini dilakukan secara deskriptif melalui kemampuan penghambatan oksidasi dihitung sebagai persentase berkurangnya serapan larutan yang mengandung senyawa penghambat oksidasi dibandingkan dengan larutan yang tidak mengandung senyawa penghambat oksidasi. Semakin besar persentase berkurangnya serapan, berarti semakin kuat kemampuan penghambatan oksidasi.

Rumus perhitungan persen penghambatan oksidasi sebagai berikut :

$$\% \text{ Penghambatan oksidasi} = \frac{S_k - S_{sp}}{S_k} \times 100\%$$

S_k = serapan kontrol negatif

S_{sp} = serapan sample

Setelah didapat persen penghambatan oksidasi antara daun srikaya (*Annona squamosa*, L) dibandingkan dengan kuersetin kemudian data dianalisis menggunakan metode analisis varian satu jalan (ANAVA) dan jika terdapat perbedaan yang bermakna antar sampel dan kuersetin.

III. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

III.1. Metode asam fosfomolibdat

Pada metode ini menunjukkan bercak yang berwarna kuning pada semua sampel setelah diuapi ammonia dan berwarna biru tua pada semua sampel setelah disemprot dengan pereaksi asam fosfomolibdat. Hal ini berarti infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L), dan kuersetin positif sebagai antioksidan. Data kromatogram uji aktivitas antioksidan dengan metode asam fosfomolibdat dapat dilihat pada tabel.

Sampel	Rf sampel	Warna bercak	
		NH ₃	Asam fosfomolibdat
Infusa	0,78	Sedikit kuning	Sedikit biru
Kuersetin	0,66	Kuning	Biru

III.2. Metode asam 2-tiobarbiturat

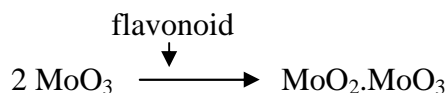
Dalam penelitian ini semua sampel menunjukkan aktivitas sebagai penghambat oksidasi. Persentase penghambatan oksidasi asam linoleat oleh infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L) serta kuersetin dapat dilihat pada tabel.

Replikasi	Infusa	Kuersetin
1	50,16	54,23
2	51,41	63,32
3	52,04	54,86
4	55,49	50,78
5	57,05	62,38
Rerata \pm SD	53,23 \pm 2,91	57,11 \pm 5,47
CV	5,47	9,58

III.3. PEMBAHASAN

Determinasi tanaman dimaksudkan untuk memastikan identitas dari tanaman srikaya (*Annona squamosa*, L), sehingga kesalahan dalam pengambilan tanaman dapat dihindari. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta dengan berpedoman pada buku *Flora of Java* (Backer dan Van den Brink, 1965)

Metode asam fosfomolibdat merupakan metode pendahuluan untuk mengetahui aktivitas senyawa antioksidan secara kualitatif. Prinsip reaksi adalah oksidasi reduksi yang dijelaskan sebagai berikut :



Pada reaksi tersebut Mo (VI) dari $\text{H}_3(\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{16})_4$ direduksi dengan adanya senyawa antioksidan menjadi Mo (IV) yang berupa campuran oksidan yang berwarna biru abu-abu (Jork, *et. al*, 1990).

Penetapan uji aktivitas antioksidan infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L) dengan metode asam 2-tiobarbiturat berdasarkan pemikiran bahwa metode ini cepat, dapat dipercaya, relatif tidak mahal, dan dapat dikerjakan dengan peralatan penelitian yang sederhana.

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode asam 2-tiobarbiturat ini dilakukan melalui pengukuran absorbansi produk *TBA-reacting substrate* (TBArS) pada panjang gelombang 532 nm. Uji ini berdasarkan atas terbentuknya warna merah jambu sebagai hasil kondensasi antara 2 molekul TBA dengan 1 molekul malondialdehida. Malondialdehida kemudian direaksikan dengan asam 2-tiobarbiturat hingga terbentuk kompleks berwarna merah jambu. Intensitas warna merah jambu ditentukan dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 532 nm.

Pengujian aktivitas antioksidan dibandingkan dengan kontrol positif kuersetin berdasarkan pertimbangan bahwa kuersetin telah diketahui memiliki aktivitas yang tinggi sebagai antioksidan (Foti *et. al*, 1996 ; Husain *et. al*, 1987). Pada awal pengujian dilakukan orientasi untuk mengetahui panjang gelombang maksimum, waktu operasional, dan konsentrasi tertinggi aktivitas antioksidan infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L).

Penentuan panjang gelombang maksimum menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum hasil reaksi antara *TBA reacting substrate* (TBArS) dengan pereaksi TBA adalah 532 nm. Pada panjang gelombang tersebut control negative memberikan absorbansi yang maksimum.

Penentuan waktu operasional yang dilakukan selama 2 jam menunjukkan bahwa hasil reaksi relatif stabil setelah waktu pemeriksaan 1 jam dari sentrifugasi, sehingga untuk pengujian selanjutnya waktu operasional ditentukan 1 jam setelah sentrifugasi untuk menyamakan kondisi.

Pada pengujian aktivitas antioksidan melalui penghambatan oksidasi terlebih dahulu dilakukan orientasi konsentrasi tinggi hingga konsentrasi rendah, kemudian dari berbagai konsentrasi tersebut ditetapkan 1 konsentrasi dengan pertimbangan supaya larutan tidak terlalu pekat sehingga mudah campur dengan larutan-larutan pereaksi dalam pengujian antioksidan dan dapat terbaca serapannya, masing-masing dibuat 5 kali replikasi.

Percobaan ini dilakukan dengan membuat dua komponen dalam 2 tabung yang berbeda, yaitu perlakuan dan tanpa perlakuan. Maksudnya perlakuan adalah terdiri dari reaksi radikal bebas yang merupakan hasil autooksidasi asam linoleat yaitu senyawa *TBA-reacting substrate* (TBArS) yang dengan adanya asam 2-tiobarbiturat akan bereaksi membentuk senyawa berwarna

merah jambu. Komponen perlakuan untuk mengetahui seberapa besar kemampuan infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L) serta pembanding kuersetin yang terbentuk dari reaksi autooksidasi, sedangkan komponen tanpa perlakuan yaitu tanpa sampel untuk mengetahui seberapa besar absorbansi *TBA-reacting substrate (TBArS)* yang terbentuk yaitu hasil reaksi dari radikal bebas yang diperoleh dari reaksi autooksidasi asam linoleat yang nantinya digunakan untuk mengetahui penghambatan oksidasi oleh infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L) serta pembanding kuersetin.

Penentuan jumlah sampel pengambilan 0,5 ml adalah untuk meminimalkan pengaruh pelarut yaitu etanol. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37° C dengan maksud supaya campuran ini konstan pada suhu sesuai suhu tubuh atau memposisikan waktu terjadinya reaksi zat aktif yang terkandung dalam tanaman dengan jaringan di dalam tubuh. Reaksi ini dihentikan dengan penambahan larutan asam 2-tiobarbiturat yang akan berikatan dengan malondialdehida sehingga terbentuk senyawa kompleks yang berwarna merah muda. Senyawa yang berwarna inilah yang diukur pada panjang gelombang 532 nm. Agar supaya pembentukan warna maksimal maka campuran tersebut dipanaskan selama 10 menit di atas penangas air mendidih.

Dalam tabung lain juga dilakukan rangkaian perlakuan seperti diatas tetapi tanpa senyawa uji atau tanpa infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L) serta pembanding kuersetin. Campuran dari tabung ini adalah terbentuknya *TBA reacting substrate (TBArS)* yang maksimal dari reaksi yang terjadi. Setelah semua rangkaian kerja atau perlakuan selesai selanjutnya langsung diukur absorbansinya pada spektrofotometer visibel, tetapi terlebih dahulu mencari panjang gelombang maksimal dari *TBA reacting substrate (TBArS)* yang terbentuk dalam tabung tanpa perlakuan dengan *me-running* pada panjang gelombang antara 200-600 nm (karena sesuai literatur panjang gelombang maksimal *TBArS* adalah 532 nm) dan diperoleh panjang gelombang maksimal dalam percobaan ini adalah 532,00 nm. Setelah itu untuk mengukur absorbansi perlakuan menggunakan panjang gelombang tersebut. Absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer tersebut adalah absorbansi sisa dari *TBArS* yang tidak terikat oleh infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L) maupun pembanding kuersetin. Dari hasil ini kemudian dianalisis dengan cara menghitung persentase penghambatan oksidasi.

Hasil dari perhitungan persen penghambatan oksidasi antar perlakuan menunjukkan bahwa kuersetin mempunyai kemampuan aktivitas antioksidan besar.

Setelah melalui Anava satu jalur diperoleh hasil bahwa $F_{hitung} > F_{tabel}$ maka dapat diambil kesimpulan bahwa pengaruh dari perlakuan dan kontrol positif (kuersetin) terhadap daya antioksidan terdapat perbedaan yang bermakna.

Infusa daun srikaya mempunyai % penghambatan oksidasi paling kecil karena dalam infusa masih mengandung zat-zat lain seperti pati, glikosida, tanin, lemak, protein (Anonim, 1986) yang masih terikut sehingga % penghambatan oksidasinya kecil dibanding jika terhidrolisis sempurna. Kuersetin mempunyai aktivitas antioksidan karena merupakan flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus hidroksi lebih banyak sehingga memiliki aktivitas yang tinggi sebagai antioksidan (Foti *et. al*, 1996; Husain, *et. al*, 1987). Hal ini disebabkan karena kemampuan antioksidan dari flavonoid tergantung afinitasnya terhadap radikal bebas dan struktur flavonoid (Bruneton, 1999).

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan : Aktivitas daya antioksidan infusa daun srikaya (*Annona squamosa*, L) adalah infusa ($53,23 \pm 2,91$) %.

V. DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1985, *Tanaman Obat Indonesia*, Jilid I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 77.
- Anonim, 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Balitbang, Departemen Kesehatan RI, Jakarta, 19.
- Backer, C.A., and Van den Brick, R.C.B., 1965, *Flora of Java*, vol. III, Wolters Noordhoff N.V., Groningen The Netherlands, 72.
- Bruneton, J., 1999, *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plant*, 2 nd edition, Lavoiser, New York, 321-331. .
- Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M.T., and Ruberto, G., 1996, Flavonoids, Coumarins, and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System Structure Activity Relationship, *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 497, 499-500.
- Husain, S.R., Cillard, J., and Cillard, P., 1987, Hydroxyl Scavenging Activity of Flavonoids, *Phytochemistry*, 26 (9), 2489.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., and Wimmer H., 1990, *Thin Layer Chromatography, Reagent and Detection Methods Fundamentals, Reagents I*, Vol Ia, VCH., New York.
- Kikuzaki, H., and Nakatani, N., 1993, Antioxidant Effects of Some Ginger Constituents, *J. Food Sci.*, 58 (6), 1407.
- Kirugawa, K., Karugi, A., Kurechi, T., 1980, *Chemistry and Implication of Degradation of Phenolic Antioxidant, Food Antioxidants*, Tokyo College of Pharmacy, Japan, 65-66.
- Medikasari, 2002, *Bahan Tambahan Makanan : Fungsi dan Penggunaan dalam Makanan*, [http : // rudycet.com/ sem 1-23/ Medikasari.htm](http://rudycet.com/sem1-23/Medikasari.htm).
- Nurani, L., H., 2004, Isolasi dan Identifikasi Flavonoid Infusa Daun Srikaya (*Annona squamosa*, L) dan Uji Antiproliferasi terhadap Sel HeLa, *Tesis*, Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

- Robinson, T., 1991, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, Edisi keenam, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung, 192-193.
- Samuelsson, G., 1999, *Drugs of Natural Origin*, 4 th revised edition, Swedish Pharmaceutical Press, Sweden, 149-153.
- Van Steenis, C. G. G. J. V., 1997, *Flora untuk Sekolah di Indonesia*, diterjemahkan oleh Moeso Surjowinoto, PT Pradnya Paramita, Jakarta, 54, 191-194.
- Wu, S., and Brewer, S., 1993, Screening Antioxidative and Prooxidative Activity in A Solid Medium Model System, *J. Food Chem*, 17 (1), 2.
- Yen, G.C., Chen, H.Y., and Peng, H.H., 1997, Antioxidant and Pro-oxidant Effect of Various Tea Extracts, *Journal Agric, Food, Chem*, Department of Food Science, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, Republic of China, Vol 45, 30-34.