

PENGARUH PERBANDINGAN PELARUT ETANOL-AIR TERHADAP KADAR SENYAWA FENOLAT TOTAL DAN DAYA ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.)

Harrizul Rivai, Ernita Widiya S. dan Rusdi
Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Padang

ABSTRACT

A Study has been conducted to determine the influence of ethanol-water ratio on the concentration of total phenolic compounds and antioxidant activities of extract of soursop leaves. Ethanol-water ratio used were ethanol 96%, ethanol-water 2:1 and ethanol-water 1:1. Concentration of phenolic compounds were determined by Folin-Ciocalteu method and antioxidant activities were determined by diphenylpicrylhydrazyl method. Results showed that the ratio of ethanol-water had a significant influence on the total content of phenolic compounds ($p < 0.05$). Highest content of total phenolic compound was obtained by using ethanol-water 1:1, whereas the highest antioxidant activity was obtained by using ethanol 96%.

Keywords : Daun Sirsak, Fenolat Total, Antioksidan

PENDAHULUAN

Di Indonesia banyak tumbuh-tumbuhan yang dapat digunakan untuk obat-obat tradisional, hanya saja pengetahuan masyarakat tentang tanaman serta khasiatnya sangat kurang. Secara alami beberapa jenis tumbuhan merupakan sumber antioksidan. Hal ini dapat ditemukan pada beberapa jenis sayuran, buah-buahan segar, beberapa jenis tumbuhan dan rempah-rempah (Darsono & Kuntorini, 2012).

Isolasi antioksidan alami telah dilakukan dari tumbuhan yang dapat dimakan, tetapi tidak selalu dari bagian yang dapat dimakan (Ismail *et al.*, 2012). Saat ini salah satu tumbuhan yang mengandung antioksidan tinggi dan telah banyak dijadikan sebagai tumbuhan obat adalah tumbuhan sirsak (*Annona muricata* L.) (Syahida *et al.*, 2012).

Sirsak termasuk family annonaceae dan genus annona. Penggunaan tanaman sirsak sebagai tanaman obat telah banyak dilakukan. Semua bagian tanaman sirsak pada dasarnya berkhasiat obat mulai dari

daun, batang, akar, buah dan biji. Namun banyak penelitian yang menyatakan bahwa daun sirsak yang dianggap sebagai bagian yang paling berkhasiat. Daun sirsak mengandung senyawa annonaceous acetogenin yang mampu mengobati kanker payudara (Rachmani *et al.*, 2012), diabetes (Adewole & Caxton-Martin, 2006), insektisida, larvasida (Tenrirawe & Pabbage, 2007), dan sebagai hepatoprotective (Arthur *et al.*, 2012). Selain itu daun sirsak juga memiliki aktivitas hipotensi, antispasmodik, antikonvulsant, vasodilator, antimikroba dan antioksidan (Taylor, 2005).

Pemanfaatan daun sirsak sebagai obat tradisional harus didukung dengan adanya berbagai penelitian agar kandungan senyawa kimia, tingkat keamanan, dan efisiensinya dapat diketahui lebih lanjut. Untuk meningkatkan mutu, keamanan dan kemanfaatan daun sirsak sebagai obat bahan alam Indonesia, perlu dilakukan standarisasi terhadap bahan bakunya, baik yang berupa simplisia maupun yang berbentuk ekstrak. Salah satu faktor yang mempengaruhi mutu ekstrak tumbuhan

obat adalah konsentrasi pelarut yang digunakan untuk ekstraksi (Gaedcke *et al.*, 2003). Pelarut yang dapat digunakan untuk membuat ekstrak daun sirsak adalah campuran etanol dan air (Badan POM, 2004). Namun perbandingan pelarut dan air untuk ekstraksi belum dioptimasi.

Oleh karena itu peneliti tertarik untuk menentukan perbandingan etanol dan air yang cocok untuk mendapatkan ekstrak yang bermutu baik dengan melakukan penentuan kadar senyawa fenolat total dengan metode Folin-Ciocalteu dan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode difenilpicrilhidrazil terhadap ekstrak daun sirsak.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah daun sirsak yang diambil dari daerah Cengkeh, (Indarung, Padang), etanol 96%, air, kloroform, HCl, metanol, toluen, besi (III) klorida, reagen Folin-Ciocalteu, natrium karbonat, asam galat, difenilpicrilhidrazil (DPPH) dan aquades. Alat-alat yang digunakan adalah alat gelas laboratorium, rotary evaporator, kertas saring, timbangan analitik, mikroskop, desikator, plat kromatografi lapis tipis (KLT) (Silica gel 60 F₂₅₄), kertas saring Whatman No.1, Spektrofotometer UV-Visible (T70 Uv-Vis Spectrophotometer).

Penyiapan Sampel

Daun sirsak dipetik kemudian dicuci hingga bersih, lalu dirajang tipis menggunakan pisau dan dihaluskan menggunakan mesin perajang. Serbuk kasar daun sirsak dikeringkan dengan oven suhu 60 °C selama 7 jam. Serbuk kering diayak dengan ayakan mesh 60 hingga didapat serbuk simplisia halus.

Karakterisasi Simplisia Spesifik dan Non-spesifik (Depkes, 2011)

1. Penetapan Kadar Air Dengan metode destilasi menggunakan toluen.

2. Penetapan Susut Pengerinan

Sebanyak 1 gram simplisia ditimbang seksama dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105 °C selama 30 menit dan telah ditara. Simplisia diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol hingga merata. Masukkan ke dalam oven, buka tutup botol, panaskan pada temperatur 100 °C sampai dengan 105 °C, timbang dan ulangi pemanasan sampai didapat berat yang konstan.

3. Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 2 gram simplisia ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam krus porselen yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan dan ditimbang kembali. Ulangi pemijaran dan penimbangan hingga bobot tetap. Kadar abu total dihitung terhadap berat ekstrak dan dinyatakan dalam % b/b.

4. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 ml asam klorida P, dicuci dengan air panas, pijar hingga bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat simplisia, dinyatakan dalam % b/b.

5. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 100 ml etanol selama 24 jam seperti tertera pada monografi, menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Disaring cepat, 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal 4 berdasar rata (yang telah ditara) diatas penangas air hingga kering, panaskan sisa pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen dihitung

terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

6. Penetapan Kadar Sari Larut Air

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 100 ml air-kloroform *P* (2,5 mL kloroform dalam 1000 mL aquadest) selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Disaring cepat, 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata (yang telah ditara) di atas penangas air hingga kering, sisa dipanaskan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

Ekstraksi Serbuk Simplisia (Depkes, 2011)

Ekstraksi sampel dilakukan dengan metoda maserasi (perendaman). Daun sirsak yang telah dirajang, ditimbang sebanyak 150 g. Satu bagian serbuk daun sirsak dimasukkan ke dalam maserator, ditambahkan 10 bagian pelarut. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96% : air (1:0), etanol 96% : air = (1 : 1), etanol 96% : air = (2 :1). Sampel direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diaduk selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Penyarian diulangi sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Maserat dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental.

Karakterisasi Ekstrak Kental (Depkes, 2011)

1. Organoleptis

Parameter organoleptik ekstrak seperti bentuk (padat, serbuk-kering, kental, cair), warna (kuning, coklat), bau (aromatik, tidak berbau), dan rasa (pahit, manis kelat). Tujuan dari parameter

organoleptik ini adalah untuk pengenalan awal yang sederhana seobyektif mungkin.

2. Penetapan Kadar Air

Dengan metode destilasi menggunakan toluen.

3. Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam krus porselen yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan dan ditimbang hingga bobot tetap. Kadar abu total dihitung terhadap berat ekstrak, dan dinyatakan dalam % b/b.

4. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 ml asam klorida *P*, dicuci dengan air panas, pijar hingga bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat simplisia, dinyatakan dalam % b/b.

Penentuan Kandungan Fenolat Total (Pourmorad, 2006; Kassim, 2011)

Larutan ekstrak yang telah dibuat dipipet 0,5 mL ke dalam labu 10 mL, ditambahkan 5 mL Folin-Ciocalteu, kemudian ditambahkan 4 mL larutan natrium karbonat 1 M, ditambahkan campuran aquadest-metanol (1:1) sampai tanda batas, lalu dikocok homogen diaduk selama 15 menit. Kemudian diukur dengan panjang gelombang 756,5 nm. Lakukan tiga kali pengulangan pada larutan ekstrak.

Penentuan Aktifitas Antioksidan dengan Metode DPPH (Molyneux, 2004; Meilandri, 2012)

Larutan ekstrak yang telah dibuat dipipet sebanyak 0,5; 1; 1,5 ; 2; dan 2,5 mL. Masing-masing diencerkan dengan metanol : air (1:1) dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 µg/mL. Kasing-masing konsentrasi dipipet

sebanyak 1 mL larutan sampel lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 1 ml larutan DPPH 100 µg/mL, ditambahkan 2 mL metanol. Campuran dihomogenkan, didiamkan selama 30 menit ditempat gelap. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515,5 nm dengan pembanding asam galat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Simplisia

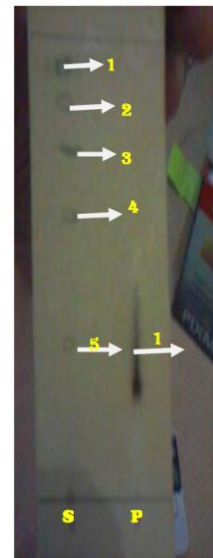
Karakterisasi serbuk simplisia daun sirsak yaitu susut pengeringan diperoleh 6,9403%, Susut pengeringan menunjukkan jumlah zat yang menguap atau hilang akibat pemanasan. Susut pengeringan serbuk simplisia daun sirsak nilainya kecil karena mengandung zat yang mudah menguap atau hilang saat dipanaskan, seperti minyak atsiri.

Kadar abu total diperoleh 5,9636%, kadar abu tidak larut asam diperoleh 0,8164%. Kadar abu total menunjukkan keseluruhan dari kandungan mineral baik internal maupun eksternal, di sini ekstrak dipanaskan hingga senyawa organik menguap sampai tinggal unsur anorganik saja. Kadar abu tidak larut asam, abu ditambahkan HCl encer, sehingga mineral internal atau mineral yang terkandung di dalam tanaman larut asam. Kadar abu yang tidak larut asam menunjukkan pengotoran yang berasal dari luar seperti pasir dan silikat.

Kadar sari larut air diperoleh 18,865% dan kadar sari larut etanol diperoleh 16,729%. Metode penentuan kadar sari digunakan untuk menentukan jumlah senyawa aktif yang terekstraksi dalam pelarut dari sejumlah simplisia.

Profil kromatografi dari simplisia daun sirsak diperoleh 5 noda yang dilihat dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm dengan Rf 0,92; 0,82; 0,75; 0,6; 0,28. Profil kromatografi simplisia daun sirsak diperlihatkan dalam Gambar 1.

Fase gerak	: Toluena-Aseton-Asam format (6:6:1)
Fase diam	: Silika gel 60 F ₂₅₄
Larutan uji	: 10 % dalam etil asetat
Larutan pembanding	: Asam galat 0,1 % dalam air
Volume penotolan	: Totolkan 20 µL Larutan uji dan 5 µL Larutan pembanding
Deteksi	: Besi (III) klorida 1%



$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh no}}{\text{jarak yang ditempuh etu}}$$

Keterangan :

S : Simplisia daun sirsak

P : pembanding asam galat

Rf Pembanding 0,28

Rf 1 : 0,92

Rf 2 : 0,82

Rf 3 : 0,75

Rf 4 : 0,6

Rf 5 : 0,28

Gambar 1. Profil kromatografi lapis tipis simplisia daun sirsak

Rendemen Ekstrak

Rendemen diperoleh 19,3046% untuk campuran pelarut etanol 96% : air (1:0), 22,8633% untuk campuran pelarut etanol 96% : air (2:1), 32,458% untuk campuran pelarut etanol 96% : air (1:1). Untuk selanjutnya ekstrak etanol 96% : air (1:0) disebut dengan Ekstrak A, ekstrak etanol 96% : air (2:1) disebut dengan Ekstrak B, ekstrak etanol 96% : air (1:1) disebut dengan Ekstrak C. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa rendemen Ekstrak C lebih tinggi, mungkin disebabkan karena tingginya kadar air yang terdapat pada Ekstrak C, sehingga sedikit air yang menguap.

Karakterisasi Ekstrak

Kadar air Ekstrak A : 11,6649%, Ekstrak B : 23,3309%, Ekstrak C : 29,9956%. Hasil perhitungan statistik kadar air dengan program SPSS, untuk hasil perhitungan ANOVA menunjukkan

bahwa nilai $F = 18,596$ dengan $\text{Sig.} = 0,003 (<0,05)$, yang berarti hasil kadar air ketiga perbandingan campuran pelarut etanol-air tersebut berbeda nyata. Kadar air paling tinggi diperoleh pada Ekstrak C.

Untuk penetapan kadar abu total sangat terkait dengan kemurnian dan adanya kontaminasi senyawa dari luar. Kadar abu total Ekstrak A : 2,3486%, Ekstrak B : 6,8824%, Ekstrak C : 10,2681%. Hasil perhitungan statistik ANOVA menunjukkan bahwa nilai $F = 672,984$ dengan $\text{Sig.} = 0,000 (<0,05)$, yang berarti rata-rata kadar abu total ketiga perbandingan campuran pelarut etanol : air tersebut berbeda nyata dan perbandingan campuran pelarut etanol-air memiliki pengaruh terhadap kadar abu total ekstrak kental daun sirsak Kadar abu tidak larut asam Ekstrak A : 0,3894%, Ekstrak B : 0,1683%, Ekstrak C : 0,4050%. Hasil perhitungan statistik ANOVA menunjukkan bahwa nilai $F = 1,079$ dengan $\text{Sig.} = 0,398 (>0,05)$, yang berarti tidak terdapat pengaruh kadar abu tidak larut asam terhadap ketiga perbandingan campuran pelarut etanol : air ekstrak daun sirsak.

Kandungan Fenolat Total pada Ekstrak Daun Sirsak

Tabel 1. Kadar fenolat total ekstrak daun sirsak yang dibuat dengan berbagai campuran etanol-air

No.	Campuran Pelarut	Absorban	Konsentrasi Senyawa Fenolat Total (µg/mL)	Kadar Senyawa Fenolat Total (mg/g)	Kadar Senyawa Fenolat Total (%b/b)	Rata-rata
1	Etanol	0,459	65,5083	6,5508	0,65508	0,6569 = 0,018
2	96%	0,46	65,6932	6,5693	0,65693	
3		0,461	65,8780	6,5878	0,65878	
4	Etanol	0,547	81,7745	8,1774	0,81774	0,8159 = 0,018
5	96% : Air (2:1)	0,546	81,5896	8,1590	0,81590	
6		0,545	81,4048	8,1405	0,81405	
7	Etanol	0,595	90,6470	9,0647	0,90647	0,9071 = 0,065
8	96% : Air (1:1)	0,599	91,3863	9,1386	0,91386	
9		0,592	90,0924	9,0092	0,90092	

Data kandungan senyawa fenolat total dapat dilihat pada Tabel 1.

Metode penetapan kadar senyawa fenolat menggunakan reagen Folin-Ciocalteu yang merupakan metode spesifik dan sensitif untuk senyawa fenol serta reagen yang digunakan dalam jumlah yang sedikit. Reagen fenol ini berwarna kuning dan akan berubah menjadi warna biru tua jika direaksikan dengan larutan simplisia dan ekstrak yang telah ditambahkan dengan natrium karbonat (Underwood, 1996).

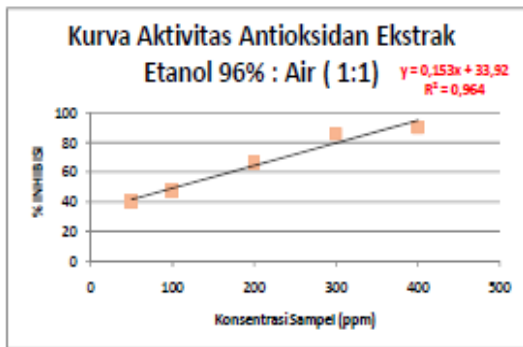
Sebelum dilakukan pengukuran absorbansi larutan asam galat maupun sampel larutan ekstrak, terlebih dahulu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum dari asam galat – Folin-Ciocalteu. Ini dilakukan untuk dapat menentukan pada panjang gelombang berapa asam galat – Folin-Ciocalteu memberikan serapan paling tinggi. Pada penentuan panjang gelombang maksimum ini digunakan larutan asam galat pada konsentrasi 80 ppm dan didapatkan panjang gelombang maksimum 756,5 nm pada serapan 0,527. Pengukuran serapan larutan asam galat didapatkan kurva kalibrasi dengan persamaan regresi $y = 0,1048 + 0,00541x$ dengan $r = 0,997$.

Kadar senyawa fenolat total menggunakan persamaan regresi linier didapatkan kadar senyawa fenolat total dalam yaitu Ekstrak A : 0,6569%, Ekstrak B : 0,8159%, Ekstrak C : 0,9071%. Hasil perhitungan statistik ANOVA menunjukkan bahwa nilai $F = 2945,395$ dengan $\text{Sig.} = 0,000 (<0,05)$, yang berarti terdapat perbedaan masing-masing kelompok pelarut terhadap kadar senyawa fenolat total. Ini artinya bahwa kadar senyawa fenolat yang paling tinggi pada perbandingan pelarut Ekstrak C sesuai dengan tingkat kepolaran dari pelarut, semakin tinggi kepolaran larutan maka senyawa fenolat akan semakin banyak terlarut, ini disebabkan karena senyawa

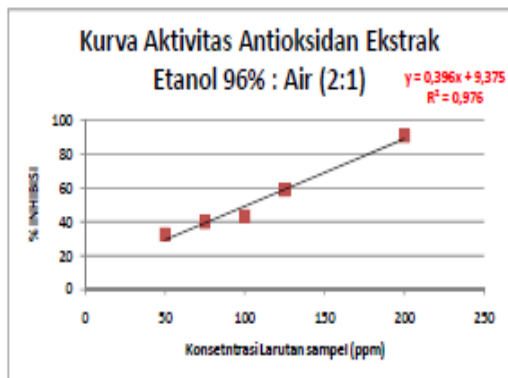
fenolat memiliki kelarutan yang baik dalam air.

Aktivas Antioksidan Ekstrak Daun Sirsak

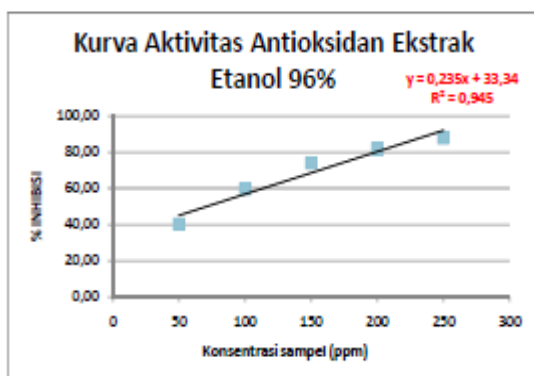
Hasil Daya antioksidan dari ekstrak daun sirsak dilihat pada Gambar 2, 3 dan 4.



Gambar 2. Aktivitas antioksidan ekstrak



daun sirsak dengan etanol 96% - air (1:1)



Gambar 3. Aktivitas antioksidan ekstrak daun sirsak dengan etanol 96 %

Gambar 4. Aktivitas antioksidan ekstrak daun sirsak dengan etanol 96 % - air (2:1)

Untuk pengujian daya antioksidan digunakan metode DPPH. DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan cepat teroksidasi karena udara dan cahaya. Tapi bila disimpan dalam keadaan kering dengan kondisi penyimpanan yang baik akan stabil dalam waktu cukup lama. Pada metode ini, DPPH berperan sebagai radikal bebas yang kemudian diredam radikal bebasnya oleh antioksidan yang terdapat pada larutan sampel membentuk 1,1-difenil-2-pikril hidrazin. Reaksi ini akan menyebabkan perubahan warna dari ungu menjadi kuning yang dapat diukur menggunakan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang 515,5 nm.

Besarnya daya antioksidan ditandai dengan IC₅₀ yakni suatu nilai yang menggambarkan besarnya konsentrasi dari ekstrak uji yang dapat menangkap radikal bebas 50% melalui persamaan garis regresi linear yang menyatakan hubungan antara konsentrasi senyawa sampel (X) dengan aktivitas penangkap radikal rata-rata (Y). Dari hasil pengukuran daya antioksidan dengan metode DPPH diperoleh nilai IC₅₀ dari tiap-tiap ekstrak adalah Ekstrak A : 70,89 µg/mL, Ekstrak B : 105,098 µg/mL, Ekstrak C : 102,59 µg/mL. Sedangkan untuk pembanding digunakan asam galat dengan nilai IC₅₀ adalah pada konsentrasi 2,2 µg/ml. Dari data diatas dapat dilihat bahwa semakin kecil nilai IC₅₀ maka senyawa tersebut memiliki keefektifan dalam menangkap radikal bebas. Hasil diatas menunjukkan bahwa yang memiliki nilai IC₅₀ paling kecil adalah Ekstrak A, artinya bahwa ekstrak ini mampu menangkap 50% radikal bebas hanya pada konsentrasi 70,89 µg/mL.

Pada data ini terlihat bahwa campuran senyawa yang memberikan kadar fenolat tinggi yaitu Ekstrak C

(campuran pelarut etanol 96% : air (1:1)) sedangkan untuk daya antioksidan tertinggi pada Ekstrak A (ekstrak etanol 96%). Senyawa fenol yang larut dipengaruhi kepolaran pelarut sedangkan daya antioksidan pelarut dipengaruhi oleh senyawa-senyawa yang larut dalam campuran tersebut. Senyawa antioksidan selain fenolat antara lain alkaloid, vit. C, vit. E, beta karoten, dan lain-lain.

Pada penelitian Matsushige *et al.*, (2012) bahwa daun sirsak juga memiliki senyawa alkaloid yang mampu bekerja sebagai antioksidan. Senyawa alkaloid, terutama indol, memiliki kemampuan untuk menghentikan reaksi rantai radikal bebas secara efisien. Senyawa radikal turunan dari senyawa amina ini memiliki tahap terminasi yang sangat lama. Beberapa senyawa alkaloid lain yang bersifat antioksidan adalah quinolon, kafein yang dapat bertindak sebagai peredam radikal hidroksil dan melatonin yang berperan penting menjaga sel dari pengaruh radiasi dan toksisitas obat-obatan (Yuhernita & Juniarti, 2011).

KESIMPULAN

Hasi penelitian ini membuktikan bahwa perbandingan campuran pelarut etanol 96 % : air (1:1) memberikan kadar senyawa fenolat lebih baik dibandingkan dengan pelarut etanol 96 % saja atau campuran pelarut etanol 96 % - air (2:1). Pelarut etanol 96 % saja memberikan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan campuran pelarutan etanol 96 % air 1:1 atau 2:1.

SARAN

Disarankan kepada peneliti selanjutnya agar melakukan penelitian pengaruh perbandingan campuran pelarut etanol-air terhadap kandungan acetogenin dari ekstrak kental daun sirsak (*Annona muricata* L.)

DAFTAR PUSTAKA

- Adewole, S.O. & Caxton-Martins, E.A. 2006. Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic B-cells of streptozotocin-treated diabetic rats, *African Journal of Biomedical Research*. 9:173 – 187.
- Arthur, F.K.N, Woode, E., Terlabi, E.O., & Larbie, C. 2012. Evaluation of hepatoprotective effect of aqueous extract of *Annona muricata* (Linn) leaf against carbon tetrachloride and acetaminophen-induced liver damage. *Journal of Nature Pharmaceuticals*. 3(1):25-30.
- Badan POM, 2004, *Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia*, Volume 1, Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Darsono, P.V. & Kuntorini, E.M. 2012. Gambaran Struktur Anatomis Dan Uji Aktivitas Antioksidan Daun Serta Batang *Hydroleaspinosa*. *Bioscientia*. 9(2):63-73.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia 2011. *Suplemen II Farmakope herbal Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Gaedcke, F., Steinhoff, B. & Blasius, H. 2003. *Herbal medicine product*. CRC Press. Stuttgart.
- Ismail, J., Runtuwene, M.R.J. & Fatimah, F. 2012. Penentuan Total Fenolik dan Uji Aktivitas Antioksidan Pada Biji dan Kulit Buah Pinang Yaki (*Areca vestiaria* Giseke). *Jurnal Ilmiah Sains*. 12(2):82-88.
- Kassim, J.M., Hussin, H.M., Achmad, A., Dahon, N. H., Suan, T.K. & Hamdan S. 2011. Determination of total phenol, condensed tannin and flavonoid contents and antioxidant activity of *Uncaria gambir* extracts. *Majalah Farmasi Indonesia*. 22(1): 50-59.

- Matsushige, A., Kotake, Y., Matsunami, K., Otsuka, H., Ohta, S., & Takeda, Y. 2012. Annonamine, a new aporphine alkaloid from the leaves of *Annonamuricata*. *Chem. Pharm. Bull.* 60(2):257—259.
- Meilandari, M. 2012. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak daun Garcinia kydia Roxb. Dengan metode Dpph dan Identifikasi Senyawa Kimia Fraksi yang Aktif*. Skripsi : Universitas Indonesia.
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenilpicrilhydrazyl (DPPH) for Esrimating Antioxidant Activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 26 (2) : 211-219.
- Pourmurad, F., Hosseinimehr, S.J. & Shahabimajd, N. 2006. Antioxidan activity, Phenol and flavonoid contens of some selected Iranian Medicinal Plants, *African Journal of Biotechnology.* 5 (11):1142-1145.
- Rachmani, E.P.N., Suhesti, T.S., Widiastuti, R., & Adityono. 2012, The breast of anticancer from leaf extract of *Annona muricata* againts cell line in T47D, *International Journal of Applied Science and Technology.* 2(1):157-164.
- Syahida, M., Maskat, M.Y., Suri, R., Mamot, S. & Hadijah H. 2012. Soursop (*Annona muricata* L.): Blood hematology and serum biochemistry of Sprague-Dawley rats. *International Food Research Journal.* 19(3):955-959.
- Taylor, L. 2005. *Technical data report for graviola (Annonamuricata)*. Austin: Sage Press.
- Tenrirawe, A. & Pabbage, M.S. 2007. Pengendalian penggerek batang jagung (*Ostrinia furnacalis* G.) dengan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.). Sulawesi Selatan: Balai Peneletian Tanaman Sereal.
- Yuhernita & Juniarti. 2011. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Metanol Daun Surian Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *MAKARA, SAINS.* 15 (1): 48-52