

**EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata*  
Linn) FORTIFIKASI NANOKITOSAN SEBAGAI  
ANTIBAKTERI DAN ANTIOKSIDAN**

*EFFECTIVENESS OF SOURSOP LEAF EXTRACT (*Annona muricata* Linn) FORTIVICATION WITH NANOCHITOSAN AS ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES*

**ITA HASMILA  
H012171009**



**PRODI MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2019**

**TESIS**

**EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn)  
FORTIFIKASI NANOKITOSAN SEBAGAI  
ANTIBAKTERI DAN ANTIOKSIDAN**

Disusun dan diajukan oleh :

**ITA HASMILA**  
**Nomor Pokok : H012171009**

Telah dipertahankan didepan Panitia Ujian Tesis  
Pada tanggal 8 Agustus 2019  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,  
Komisi Penasehat



**Dr. Hasnah Natsir, M.Si**  
Ketua



**Prof. Dr. Nunuk Hariani S, MS**  
Anggota

Ketua Program Studi  
Magister Kimia,



**Dr. Hasnah Natsir, M.Si**

Dekan Fakultas MIPA  
Universitas Hasanuddin,



**Dr. Eng. Amiruddin, M.Si**

**EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata*  
Linn) FORTIFIKASI NANOKITOSAN SEBAGAI  
ANTIBAKTERI DAN ANTIOKSIDAN**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi  
Kimia

Disusun dan diajukan Oleh

**ITA HASMILA**

Kepada

**PRODI MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2019**

## **PERNYATAAN KEASLIAN TESIS**

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Ita Hasmila  
Nomor mahasiswa : H012171009  
Program studi : Kimia

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 8 Agustus 2019

Yang menyatakan

Ita Hasmila

## PRAKATA

Segala puji hanya milik Allah *'Azza wa Jalla*, kepada-Nya penulis memohon pertolongan dan ampunan-Nya, serta bertaubat kepada-Nya dari segala keburukan. Berkat rahmat dan taufik-Nya sehingga tesis ini dapat terselesaikan. Salam dan shalawat semoga senantiasa tercurahkan kepada Sayyid (panutan) kita dan pemimpin para makhluk, Rasulullah Muhammad *Shalallahu 'alaihi wa Sallam*, beserta keluarga, sahabat, dan para pengikutnya yang baik dan setia hingga hari kiamat.

Alhamdulillah penelitian yang berjudul "**Efektivitas Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) Fortifikasi Nanokitosan sebagai Antibakteri dan Antioksidan**" ini telah kami susun dalam rangka memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S2) dari jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Gagasan yang melatari tajuk permasalahan ini timbul dari hasil pengamatan penulis terhadap pemanfaatan bahan alam dalam mengatasi permasalahan kesehatan masyarakat, khususnya daun sirsak dan nanokitosan serta fortifikasi keduanya sebagai antibakteri dan antioksidan.

Berbagai kendala dan tantangan yang dialami penulis namun berkat do'a, motivasi, dan dukungan dari berbagai pihak, maka tesis ini dapat diselesaikan. Dalam kesempatan ini penghargaan khusus penulis sampaikan kepada orang tua (Bapak Almarhum Mido' dan Ibunda Harabi)

serta mertua kami (Bapak Sirajuddin dan Ibunda Suriyani, S.Pd) atas segala bantuan, motivasi dan mendukung dengan penuh kasih sayang dan kesabaran serta senantiasa mendoakan keberhasilan penulis, juga kepada adikku satu-satunya Muhammad Dirham, A.Md atas segala bantuan, motivasi dan doanya. Permohonan maaf dan ucapan terima kasih kepada suami Adrian Ariono A.Md.Kg dan putriku tercinta Fakhirah Hafidzhah atas kesabaran, do'a dan dukungannya yang senantiasa mengiringi langkah penulis dengan penuh ikhlas *jazaakumullahu khairan katsiran*, semoga Allah memberkahi kalian semua. Aamiin.

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada dosen pembimbing, Ibu Dr. Hasnah Natsir, M.Si dan Ibu Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, M.S sekaligus sebagai penasehat akademik penulis yang telah sabar memberikan bimbingan dan arahan selama penulis di bangku kuliah hingga dapat menyelesaikan penelitian ini. Tak lupa pula penulis ucapkan terima kasih kepada Bapak Prof. Dr. H. Abd. Wahid Wahab, M.Sc, Ibu Dr. Paulina Taba, M.Phil, dan Ibu Dr. Rugaiyah Arfah, M.Si sebagai tim penguji yang telah banyak memberikan arahan dan masukan yang sangat bermanfaat untuk penulis.

Segenap hati tulus dan penuh hormat penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Rektor Universitas Hasanuddin Makassar, Dekan Sekolah Pascasarjana Unhas, Dekan FMIPA Unhas Bapak Dr. Eng. Amiruddin, S.Si, M.Si., Ketua Program Studi Magister Kimia FMIPA Unhas Ibu Dr. Hasnah Natsir, M.Si., beserta seluruh staf atas ilmu

dan dukungan yang telah diberikan selama perkuliahan. Terima kasih pula penulis sampaikan kepada Kepala Laboratorium Biokimia Ibu Dr. Rugaiyah Arfah, M.Si dan staf Laboratorium Biokimia Ibu Mahdalia, S.Si. M.Si dan Andi Akbar S.Si. atas segala bantuannya dalam melaksanakan penelitian ini.

Terima kasih pula penulis sampaikan kepada seluruh analis pada Departemen Kimia FMIPA Unhas, Pak Sugeng, Ibu Tini, Ibu Linda, dan Kak Febhy serta staf analis XRD Science Building, Kak Anto yang telah banyak membantu penulis selama melakukan penelitian.

Terima kasih kepada teman-teman Program Magister Kimia yang telah memberi dukungan dan bantuan kepada penulis selama perkuliahan hingga mengerjakan tugas akhir dan juga kepada teman-teman seperjuangan di Lab Biokimia, khususnya partner penelitian Andi Citra Junopia dan Triswono Ramdhan Zarkoni yang telah kebersamai penulis dalam berjuang bersama menyelesaikan penelitian ini.

Sahabat ukh Asmi dan Icha, terima kasih banyak penulis ucapkan sejak memulai perkuliahan pada Program Magister Kimia telah memberi motivasi dan mendoakan penulis serta bersama-sama berbagi suka dan duka dalam berbagai hal *jazaakumullahu khairan katsiran*, semoga lancar hingga selesai Program Doktoralnya ukhtifillah.

Kakak-kakak senior Program Magister Kimia, kak Leliani, Kak Sartika, Kak Liska dan ukh Bahriah terima kasih banyak penulis ucapkan atas motivasi, dukungan dan mendoakan penulis dan juga kepada adik-

adik mahasiswa S1 di Laboratorium Biokimia dan Organik yang sudah sangat banyak membantu penulis, semoga Allah membalas kebaikan kalian. aamiin

Terima kasih kepada sahabat-sahabatku Ukh Ilvy, Ros, Mely, Mawaddah, Icha, Kak Nurmasita, Kak Deyha, Kak Nur Fitriani, Kak Eka serta teman-teman halaqah tarbiyah dan pengurus dakwah Muslim Cerdas (MuDas) atas segala motivasi dan do'anya.

Terima kasih pula kepada seluruh keluarga besar penulis yang selalu memberikan semangat, dorongan, dan doanya untuk keberhasilan penulis serta kepada semua pihak yang tidak sempat penulis sebutkan namanya yang telah mengisi hari-hari penulis dalam berbagai aktivitas, terima kasih atas segala bantuan, perhatian, motivasi, canda tawa dan kebersamaannya dalam suka dan duka.

Tiada kata yang lebih berharga yang dapat penulis sampaikan selain ucapan terima kasih dan rasa syukur yang mendalam. Semoga Allah SWT membalas segala bantuan yang telah diberikan dan bernilai ibadah disisi-Nya dan mendapat pahala yang setimpal. Aamiin.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tulisan ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik dan saran dari semua pihak sangat kami harapkan demi kesempurnaannya.

Makassar, Agustus 2019

**Ita Hasmila**

## ABSTRAK

ITA HASMILA. *Efektivitas Ekstrak Daun Sirsak (Annona muricata Linn) Fortifikasi Nanokitosan sebagai Antibakteri dan Antioksidan* (dibimbing oleh Dr. Hasnah Natsir, M.Si dan Prof. Dr. Nunuk Hariani S. M.S).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dari ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn), mengkarakterisasi nanokitosan yang diperoleh meliputi analisis ukuran partikel dan bentuknya, menganalisis efektivitas ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn), nanokitosan, dan pengaruh fortifikasi keduanya terhadap aktivitas antibakteri dan antioksidan. Metode penelitian yang dilakukan adalah ekstraksi dan uji fitokimia daun sirsak (*A. muricata* L.) yang diperoleh dari Desa Tambangan, Bulukumba. Pembuatan nanokitosan dengan metode gelasi ionik, uji antibakteri dengan metode difusi agar dan antioksidan dengan metode 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) terhadap ekstrak daun sirsak, nanokitosan dan fortifikasi ekstrak daun sirsak dengan nanokitosan. Karakterisasi nanokitosan dilakukan dengan alat FTIR, XRD dan TEM. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang terkandung dari ekstrak daun sirsak (*A. muricata* Linn) adalah steroid, alkaloid, flavonoid, fenolik dan saponin. Karakteristik nanokitosan yang diperoleh berupa amorf, berbentuk heksagonal tidak seragam dan ukuran partikel berkisar antara 14,10 hingga 78,59 nm, serta daun sirsak (*A. muricata* Linn) dan nanokitosan memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan antioksidan. Pada fortifikasi ekstrak daun sirsak (*A. muricata* Linn) dan nanokitosan yang tertinggi dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara berturut-turut pada perbandingan 3:1 dan perbandingan 1:3 serta berpengaruh meningkatkan kemampuan aktivitas antioksidan tertinggi pada perbandingan 3:1 dengan  $IC_{50}$  131,749.

## ABSTRACT

ITA HASMILA. *Effectiveness of Soursop Leaf Extract (Annona muricata Linn) Fortification with Nanochitosan as Antibacterial and Antioxidant* (guided by Dr. Hasnah Natsir, M.Si and Prof. Dr. Nunuk Hariani S. M.S).

This study aims to identify secondary metabolite compounds that contained in soursop leaf extract (*Annona muricata* Linn), characterize the nanochitosan including analysis of particle size and shape, effectiveness of soursop leaf extract (*Annona muricata* Linn), nanochitosan, and the fortification effect of soursop leaf extract and nanochitosan to antibacterial and antioxidant. Research methods were extraction and phytochemical test of soursop leaf (*A. muricata* L.) from Tambangan Village, Bulukumba. Nanochitosan was made by ionic gelation method. Antibacterial analysis was by using agar diffusion method. The antioxidant test of soursop leaf extract, nanochitosan and the fortification materials was by using 2,2-diphenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) method. The characteristics of nanochitosan were carried out by FTIR, XRD and TEM. The results showed that secondary metabolite compounds in soursop leaf extract (*A. muricata* Linn) were steroid, alkaloid, flavonoid, phenolic and saponin. Characteristic of nanochitosan was amorphous with non-uniform hexagonal shape and particle sizes ranges between 14,10 to 78.59 nm. Soursop leaf extract, nanochitosan and the fortification materials have antibacterial and antioxidant activities. The highest antibacterial activity of the fortification materials in inhibiting *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria was in ratio of 3:1 and 1:3, respectively. The highest antioxidant activity was in a ratio of 3:1 with IC<sub>50</sub> 131,749.

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN TESIS	ii
HALAMAN PENGAJUAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	6
C. Tujuan Penelitian	7
D. Manfaat Penelitian	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	8
A. Uraian Tentang Daun Sirsak ( <i>Annona muricata</i> Linn)	8
B. Uraian Tentang Kitosan	14
C. Uraian Tentang Nanokitosan	22

D. Uraian Tentang Antibakteri	26
E. Uraian Tentang Antioksidan	28
F. Kerangka Konseptual	34
G. Hipotesis	36
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b>	<b>37</b>
A. Waktu dan Tempat Penelitian	37
B. Bahan dan Alat Penelitian	37
1. Alat penelitian	37
2. Bahan penelitian	37
C. Prosedur Penelitian	38
1. Ekstraksi sampel daun sirsak	38
2. Uji fitokimia ekstrak daun sirsak	39
3. Pembuatan nanokitosan dengan metode gelasi ionik	40
4. Uji antibakteri	41
5. Uji antioksidan	43
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	<b>45</b>
A. Ekstraksi sampel daun sirsak ( <i>Annona muricata</i> Linn)	45
B. Uji fitokimia ekstrak daun sirsak ( <i>Annona muricata</i> Linn)	47
C. Karakteristik Kitosan	53
D. Sintesis dan Karakteristik Nanokitosan	57
E. Uji Aktivitas Antibakteri	66
F. Uji Aktivitas Antioksidan	75

BAB II. KESIMPULAN DAN SARAN	83
A. Kesimpulan	83
B. Saran	84
DAFTAR PUSTAKA	85
LAMPIRAN	94

## DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Skrining fitokimia berbagai bagian dari sirsak ( <i>A. muricata</i> L.)	11
2. Beberapa penelitian tentang antibakteri daun sirsak	13
3. Beberapa penelitian tentang antioksidan daun sirsak	13
4. Sifat-sifat dan pemanfaatan kitosan	16
5. Serapan FTIR karakteristik untuk kitin dan kitosan	17
6. Spesifikasi kitosan niaga	19
7. Penelitian tentang antibakteri dan antioksidan kitosan	20
8. Konsentrasi minimum (KM) dari kitosan yang mampu menghambat beberapa mikroorganisme	21
9. Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH	33
10. Hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun <i>A. muricata</i> L.	48
11. Hasil karakterisasi produk kitosan	55
12. Diameter zona hambatan dari ekstrak daun <i>A. muricata</i> L.	68
13. Diameter zona hambatan dari nanokitosan	72
14. Diameter zona hambatan dari fortifikasi daun <i>A. muricata</i> L. dan nanokitosan	74
15. Aktivitas antioksidan pada <i>A. muricata</i> L.	75
16. Aktivitas antioksidan pada nanokitosan	76
17. Aktivitas antioksidan fortifikasi daun <i>A. muricata</i> L. dan nanokitosan perbandingan 1:1	76
18. Aktivitas antioksidan fortifikasi daun <i>A. muricata</i> L. dan nanokitosan perbandingan 2:1	76

19.	Aktivitas antioksidan fortifikasi daun <i>A. muricata</i> L. dan nanokitosan perbandingan 3:1	77
20.	Aktivitas antioksidan fortifikasi daun <i>A. muricata</i> L. dan nanokitosan perbandingan 1:2	77
21.	Aktivitas antioksidan fortifikasi daun <i>A. muricata</i> L. dan nanokitosan perbandingan 1:3	77
22.	Aktivitas antioksidan asam askorbat (kontrol positif)	78

## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Daun sirsak	10
2. Proses deasetilasi kitin menjadi kitosan	15
3. Sintesis nanopartikel: <i>top-down</i> dan <i>bottom-up</i>	24
4. Ilustrasi matriks nanopartikel dengan metode gelasi	26
5. Kerangka konseptual	35
6. Reaksi uji Meyer	49
7. Reaksi uji Wagner	50
8. Reaksi uji flavonoid	51
9. Reaksi uji fenolik	52
10. Reaksi uji terpenoid dan steroid	53
11. Kitosan dari cangkang kepiting merah <i>Pharma grade</i>	54
13. (a) Larutan nanokitosan (b) Serbuk nanokitosan	58
14. Proses ikat silang ionik kitosan dengan TPP	59
15. Penambahan surfaktan tween 80 dalam pembentukan nanokitosan	60
16. Spektra IR (a.) Kitosan (b). Na-TPP (c). Nanokitosan	62
17. Pola difraksi sinar-X nanokitosan	65
18. Morfologi nanopartikel pada TEM pada perbesaran (a) 500nm (b) 200nm (c) 100 nm	66
19. Reaksi penghambatan radikal bebas DPPH oleh antioksidan	82

## DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

---

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
<b>ANOVA</b>	Analysis of Varians
<b>CFU</b>	Coloni Forming Units/ Jumlah koloni bakteri per unit
<b>Cps</b>	Centipoise (satuan kekentalan)
<b>DA</b>	Dasetilasi, yaitu proses penghilangan gugus asetil
<b>DD</b>	Derajat Deasetilasi (persentase gugus asetil yang hilang)
<b>DM</b>	Demineralisasi, yaitu proses penghilangan mineral
<b>DP</b>	Deproteinase, yaitu proses penghilangan protein
<b>DPPH</b>	Diphenyl Picrylhydrazyl
<b>FTIR</b>	Fourier Transform Infra Red/ spektroskopi infra merah
<b>MHA</b>	Media Hinton agar (Mullon Hinton Agar)
<b>TEM</b>	Transmission Electron Microscopy/Mikroskop Pemindai Elektron
<b>XRD</b>	X-Ray Difrraction
<b>TPP</b>	Tripoliposfat

---

## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Bagan kerja ekstraksi daun sirsak ( <i>Annona muricata</i> Linn.)	94
2. Bagan uji fitokimia	95
3. Bagan kerja proses pembuatan nanokitosan	97
4. Bagan kerja uji antibakteri ekstrak daun sirsak, nanokitosan dan fortifikasi ekstrak daun sirsak dengan nanokitosan	98
5. Bagan kerja uji antioksidan ekstrak daun sirsak, nanokitosan dan fortifikasi ekstrak daun sirsak dengan nanokitosan	99
6. Spektroskopi FTIR pada kitosan, NaTPP dan nanaokitosan	100
7. Diameter pada XRD	103
8. Data spektrum XRD nanokitosan	104
9. Perhitungan aktivitas antimikroba	106
10. Perhitungan aktivitas antioksidan	110
11. Foto proses ekstraksi daun <i>A. muricata</i> L.	125
12. Karakteristik kitosan	127
13. Sintesis dan karakterisasi nanokitosan	128

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Penggunaan obat herbal baik dari tanaman ataupun sumber daya hayati laut telah digunakan secara tradisional oleh masyarakat Indonesia untuk mengatasi permasalahan kesehatan. Pengetahuan tentang tanaman berkhasiat obat didasarkan pada pengalaman dan keterampilan secara turun temurun. Masyarakat memilih obat herbal karena obat-obatan tersebut tidak memiliki efek samping, cukup mudah memperolehnya, biaya murah dan sebagai dukungan pelaksanaan program *go green* (kembali ke alam). Adanya tanaman obat dari alam yang tumbuh melimpah di Indonesia, meningkatkan penggunaan obat tradisional dan semakin berkembang luas di masyarakat (Mardiana, *et al.*, 2015).

Salah satu jenis tanaman obat yang sering dimanfaatkan di Indonesia adalah sirsak (*Annona muricata* Linn). Sirsak merupakan tumbuhan dengan berbagai macam manfaat bagi kesehatan baik yang diperoleh dari daging buah, kulit batang, bunga, akar, biji maupun daunnya (Mardiana, *et al.*, 2015). Menurut Depkes (2018), manfaat daun sirsak dalam bidang kesehatan diantaranya untuk mencegah dan

mengobati penyakit kanker, mengobati wasir, menurunkan kolesterol dan menghilangkan jerawat.

Beberapa penelitian ilmiah juga telah membuktikan khasiat dari ekstrak daun sirsak. Ekstrak etanol, metanol, etil-asetat dan n-heksan daun sirsak bersifat aktif terhadap bakteri dan jamur seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, (Fibonacci dan Hulyadi, 2018; Olugbuyiro, *et al.*, 2017; Lawal, *et al.*, 2017; Tuna, dkk, 2015; Sulastrianah, 2014). Ekstrak etanol, air dan n-heksan daun sirsak menunjukkan sifat antioksidan dengan menetralkan radikal bebas menggunakan metode DPPH (Lawal, *et al.*, 2017; Gavamukulya, *et al.*, 2014).

Manfaat ekstrak daun sirsak sebagai antioksidan yang dilaporkan berkorelasi dengan kandungan senyawa metabolit sekunder. Daun sirsak memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder fenol, flavonoid, alkaloid, dan lipid esensial (Agu, *et al.*, 2017). Hal ini didukung oleh penelitian Gavamukulya, *et al* (2014), tentang skrining fitokimia ekstrak etanol daun sirsak mengandung senyawa alkaloid, saponin, terpenoid, flavonoid, kumarin, lakton, antrakuinon, fenol, dan fitosterol.

Senyawa metabolit sekunder tersebut memiliki banyak manfaat, seperti flavonoid berfungsi sebagai antioksidan dan antikanker, terpenoid, alkaloid dan fenol berperan sebagai antibakteri dan anti jamur (anti mikroba), saponin berfungsi membantu meningkatkan sistem kekebalan tubuh, antioksidan, antibakteri, antikarsinogenik, anti tumor dan

menurunkan resiko kanker (Kumoro, 2015). Selain itu, kandungan lain dalam daun sirsak adalah adanya senyawa asetogenin, yang berfungsi sebagai antiparasit, antihiperqlikemik, antikanker, antiradang, analgesik, penyembuhan luka, antioksidan serta antibakteri (George, *et al.*, 2017; Sumantri, dkk., 2014).

Penelitian terkait sumber antibakteri dan antioksidan terus mengalami perkembangan. Selain daun sirsak, sumber antibakteri dan antioksidan lain yang sampai saat ini potensial terus dikembangkan adalah kitosan. Kitosan adalah suatu polisakarida yang diperoleh dari hasil deasetilasi kitin, yang umumnya berasal dari limbah kulit hewan *Crustacea*, seperti cangkang kepiting, rajungan, kerang dan kulit udang (Hargono, dkk., 2008).

Kitosan dapat diaplikasikan sebagai antikanker, anti-inflamasi, antioksidan dan antimikroba (Gumgumjee, *et al.*, 2018; Kumari dan Dutta, 2010; Nadia, dkk; 2014; Samar, *et al.*, 2013). Kitosan memiliki kemampuan sebagai antioksidan karena dapat menetralsir radikal bebas. Kitosan juga memiliki aktivitas anti bakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus* (Samar, *et al.*, 2013). Menurut hasil penelitian Gumgumjee, *et al* (2018), kemampuan antibakteri dari kitosan juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigella dysenteriae* dengan jalan merusak membran sel karena memiliki muatan positif kitosan yang kuat dapat mengikat muatan negatif dari senyawa lain.

Kemampuan kitosan yang diterapkan dalam berbagai bidang industri modern seperti bidang farmasi, biokimia, kosmetika, pertanian, industri pangan, dan industri tekstil, mendorong para peneliti dan praktisi industri untuk terus mengembangkannya dalam berbagai penelitian, termasuk melakukan modifikasi kitosan secara kimia atau fisik. Modifikasi fisik pada kitosan mencakup perubahan ukuran partikel menjadi lebih kecil untuk pemanfaatan yang lebih luas. Perkembangan modifikasi fisik mengarah ke bentuk nanopartikel. Nanopartikel kitosan merupakan kitosan yang partikelnya berukuran 1-100 nm (Mohanraj dan Chen, 2006). Nanokitosan mempunyai keunggulan bersifat reaktif, mampu meningkatkan kelarutan senyawa atau zat aktif, mengurangi dosis pengobatan dan meningkatkan absorpsi obat dari kitosan (Suwarda dan Maarif, 2012).

Keunggulan nanokitosan tersebut akan semakin meningkatkan aplikasinya dalam berbagai bidang kehidupan seperti menangani pencemaran air, adsorben, penyembuh luka, pelepasan obat, penurun kolesterol, antikanker, antioksidan dan antibakteri. Keunggulan nanokitosan tersebut dapat meningkatkan kesehatan masyarakat dalam melawan berbagai penyakit. Perkembangan penyakit saat ini semakin meningkat jumlahnya yang disebabkan oleh bakteri patogen, seperti bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Bakteri *S. aureus* merupakan jenis bakteri patogen utama pada manusia yang bertanggung

jawab atas 80% penyakit supuratif (peradangan) dengan permukaan kulit sebagai habitat alaminya (Volk, 1993).

Selain penyakit akibat bakteri patogen, penyebab penyakit lainnya terjadi karena perubahan pola hidup dan pola makan pada masyarakat. Hal ini mengakibatkan pola perkembangan penyakit telah bergeser dari penyakit infeksi ke penyakit degeneratif seperti inflamasi jaringan, mutasi gen kanker, katarak, penuaan dini, tumor, diabetes sehingga tubuh membutuhkan senyawa antioksidan. Senyawa antioksidan berperan sebagai penangkal utama radikal bebas, oksidasi asam nukleat, protein, lemak, dan DNA dengan cara mengikat radikal bebas atau molekul reaktif lainnya, sehingga berbagai penyakit degeneratif dan kelainan biologis dapat dicegah (McGee, dkk., 2006; Setiyanto, 2012).

Peranan antioksidan sangat penting dalam menetralkan dan menghancurkan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel dan juga merusak di dalam biomolekul. Dalam jumlah yang sedikit, radikal bebas dapat dinetralkan oleh sistem enzimatik tubuh seperti enzim katalase, glutathione peroksidase, superoksida dismutase dan glutathione-S-transferase. Bila jumlah radikal bebas dalam tubuh berlebih maka dibutuhkan antioksidan yang berasal dari luar tubuh (eksogenik) seperti flavonoid, vitamin A, vitamin C dan vitamin E (Setiyanto, 2012). Sehingga untuk meningkatkan kesehatan masyarakat, sumber-sumber antioksidan maupun antibakteri yang potensial perlu terus dikembangkan.

Penelitian tentang fortifikasi ekstrak daun sirsak dan nanokitosan perlu dilakukan karena daun sirsak dan nanokitosan diketahui memiliki kemampuan sebagai antibakteri dan antioksidan, namun belum pernah dilakukan fortifikasi terhadap kedua bahan tersebut. Diharapkan dengan adanya fortifikasi ekstrak daun sirsak dengan nanokitosan, maka dapat meningkatkan kemampuannya sebagai antibakteri dan antioksidan. Atas dasar pemikiran tersebut, maka dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efektivitas ekstrak daun sirsak (*A. muricata* L.) yang difortifikasi kitosan sehingga dapat dimanfaatkan sebagai solusi dari permasalahan kesehatan.

## **B. RUMUSAN MASALAH**

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. senyawa metabolit sekunder apa yang terkandung dari ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn)?
2. bagaimana karakteristik nanokitosan yang diperoleh meliputi analisis ukuran partikel dan bentuknya?
3. bagaimana efektivitas antibakteri dan antioksidan dari ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dan nanokitosan?
4. bagaimana pengaruh fortifikasi nanokitosan pada ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap aktivitas antibakteri dan antioksidannya?

### **C. TUJUAN PENELITIAN**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

1. mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dari ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn).
2. mengkarakterisasi nanokitosan yang diperoleh meliputi analisis ukuran partikel dan bentuknya.
3. menganalisis efektivitas antibakteri dan antioksidan dari ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dan nanokitosan.
4. menganalisis pengaruh fortifikasi nanokitosan pada ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap aktivitas antibakteri dan antioksidannya.

### **D. MANFAAT PENELITIAN**

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai berikut :

1. sebagai informasi ilmiah tentang potensi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) yang difortifikasi nanokitosan sebagai antibakteri dan antioksidan.
2. meningkatkan pemanfaatan sumber daya alam dan pengembangan ketersediaan obat-obatan, khususnya dari daun sirsak dan cangkang kepiting sehingga menambah nilai ekonomis.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Uraian Tentang Sirsak (*Annona muricata* Linn)

##### 1. Tinjauan umum sirsak (*Annona muricata* Linn)

Sirsak merupakan salah satu tanaman buah yang berasal dari Karibia, Amerika Tengah dan Amerika Selatan, termasuk Amerika Utara, Amerika Timur Laut dan daerah Tenggara Brazil. Tumbuhan ini menyebar luas ke Asia di antaranya Thailand, Malaysia, dan Indonesia. Pada abad ke-19, tumbuhan sirsak mulai dibudidayakan di Malaysia dan Indonesia (Sukarmin, 2010). Beberapa sinonim dari *A. muricata* Linn diantaranya adalah *A. macrocarpa*, *A. bonplandiana*, *A. cearensis* dan *Guanabanus muricatus* (Noller, 2005).

Menurut Tjitrosoepomo (1991), tumbuhan sirsak dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Class	: Dicotyledoneae
Sub Kelas	: Dialypetalae
Ordo	: Ranales
Family	: Annonaceae
Genus	: <i>Annona</i>
Spesies	: <i>Annona muricata</i> Linn

## 2. Manfaat sirsak

Sirsak (*A. muricata* L.) sudah lama dikenal dan lazim dimanfaatkan sebagai obat secara turun temurun oleh masyarakat Indonesia. Pohon sirsak dapat tumbuh tanpa perawatan khusus di kebun atau halaman rumah. Pada zaman dahulu, tanaman sirsak hanya dikenal di masyarakat untuk pengobatan luar, khususnya penyakit kulit. Akan tetapi, sejak tahun 2010, buah sirsak diketahui dapat berkhasiat untuk mengobati disentri, empedu akut, dan kencing batu. Daunnya juga bermanfaat untuk mengatasi sakit kepala, insomnia, penyakit hati, diabetes, hipertensi dan sebagai anti-inflamasi, antispasmodik, disentri, luka borok, bisul, kejang, jerawat, dan kutu rambut (Mardiana, 2015).

Di Afrika tropis, termasuk Nigeria, tanaman sirsak baik dari akar, kulit batang dan daun umumnya digunakan sebagai antiparasit, antispasmodik, zat antikanker, obat penenang, hipotensi, insektisida, batuk, demam, diare, disentri dan penyakit kulit (Adewole dan Ojewole, 2009).

Menurut Depkes (2018), manfaat daun sirsak dalam bidang kesehatan diantaranya sebagai pencegah sekaligus mengobati penyakit kanker, mengobati wasir, menurunkan kolesterol dalam tubuh dan untuk kecantikan bermanfaat untuk menghilangkan jerawat.

Hasil penelitian menyebutkan bahwa daun sirsak efektif sebagai antioksidan, antibakteri dan antifungi (Lawal, *et al.*, 2017), anti-mutagenik, antioksidan, antimikroba dan antidiabetes (Endrini, dkk., 2015),

antiinflamasi, insektisida, larvisida, sitotoksik ke sel kanker, antistress, imunomodulator, antimalaria, antidepresan, penyembuhan luka, hipoglikemik, antikanker dan antitumor (Gavamukulya, *et al.*, 2014), antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* (Olugbuyiro, *et al.*, 2017). Gambar daun sirsak dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Daun sirsak (Dokumentasi Pribadi, 2019)

Daun sirsak mampu mengatasi jerawat. Bakteri yang sering ditemukan pada jerawat adalah bakteri gram positif yaitu *S.aureus* dan *Propionibacterium acnes*. Bakteri *S. aureus* biasanya terdapat pada saluran pernafasan atas, kulit, saluran kencing, mulut dan hidung, jaringan kulit bagian dalam dari bisul bernanah, infeksi luka, radang paru-paru dan selaput lendir lainnya (Jawetz, 2001; Rusmiyati, dkk., 2017). Sedangkan bakteri *E. coli* dapat menimbulkan pneumonia, endokarditis, infeksi pada luka dan abses pada berbagai organ (Indah, 2009).

### 3. Kandungan dalam daun sirsak (*A. muricata* L.)

Daun sirsak merupakan bagian dari tanaman sirsak yang memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder seperti fenol, flavonoid, tanin, fitosterol, kalsium oksalat, alkaloid, steroid, kardiak glikosida, antrakuinon, saponin, kumarin, dan minyak steroid (Sunarjono, 2005).

Hasil skrining fitokimia dari ekstrak metanol berbagai bagian dari sirsak yang dilakukan oleh Agu, *et al.*, (2017) memperoleh hasil penelitian yang ditampilkan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Skrining fitokimia berbagai bagian sirsak (*A. muricata* L.) (Agu *et al.*, 2017)

Fitokimia	Buah	Daun	Akar-kulit	Kulit Batang
Tanin	+	+	+	+
Flavonoid	+	+	+	+
Saponin	+	+	+	+
Phlobatannins	-	-	-	-
Terpenoid	+	+	+	+
Karbohidrat	+	+	+	+
Glikosida jantung	-	+	+	-
Monosakarida	+	+	+	+
Pentosa	+	+	+	+
Ketosa	+	+	+	+
Pati	+	+	+	+
Protein	+	+	+	+
Arginin	+	+	+	+
Sistein	+	+	+	+
Asam amino aromatik	+	+	+	+
Asam amino fenolik	+	+	+	+
Antrakuinon	-	-	-	-
Alkaloid	+	+	+	+
Steroid	+	+	+	+
Fenolat	+	+	+	+
Nitrogen dan halida (Cl <sup>-</sup> )	+	+	+	+
Sulfur and sulfate ion	+	+	+	+
Nitrat ion	+	+	+	+

Hasil penelitian Kumar, dkk., (2013) juga menyebutkan bahwa ekstrak daun *A. muricata* L. sangat kaya akan kandungan fitokimia, diantaranya alkaloid, megastigmanes, flavonol triglikosida, fenolat, siklopeptida, minyak esensial serta asetogenin Annonaceous. Selain kandungan tersebut, daun *A. muricata* L. juga terdapat kandungan mineral seperti kalium, kalsium, natrium, tembaga, besi dan magnesium.

Ekstrak metanol daun *A. muricata* L. mengandung metabolit sekunder seperti tannin dan steroid (Pathak, dkk., 2010); ekstrak etanol daun *A. muricata* L. mengandung senyawa flavonoid, yang mana senyawa–senyawa tersebut dapat berfungsi sebagai desinfektan–antiseptik (Takahashi, 2016), senyawa fenolik, flavonoid, tanin, alkaloid, saponin dan glikosida (Olugbuyiro, *et al.*, 2017). Daun *A. muricata* L. juga mengandung senyawa asetogenin yang memiliki banyak manfaat antara lain sebagai antikanker, antitumor, anti-inflamasi, antidepresi, antivirus, antibakteri (Zuhud, 2011), larvasida, insektisida, antiparasit, bakterisida serta memiliki toksisitas yang efektif terhadap serangga dari beberapa ordo seperti Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera dan Diptera (Abubacker, *et al.*, 2014).

#### **4. Beberapa penelitian tentang daun sirsak sebagai antibakteri dan antioksidan**

Pada daun sirsak telah dilakukan beberapa penelitian antibakteri diantaranya dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Beberapa penelitian tentang antibakteri daun sirsak

Hasil penelitian	Referensi
Ekstrak etil asetat ditemukan sangat aktif terhadap bakteri gram positif <i>S. aureus</i> .	Olugbuyiro, <i>et al.</i> , 2017
Ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhi</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. notatum</i> dan <i>R. stolonifer</i> .	Lawal, <i>et al.</i> , 2017
Ekstraksi n-heksan dan metanol membuktikan adanya aktivitas antimikroba terhadap <i>B. subtilis</i> dan <i>E. coli</i> .	Fibonacci dan Hulyadi, 2018
Ekstrak etanol mempunyai efek antimikroba terhadap <i>C. diphtheria</i> .	Immanuel, 2014
Ekstrak metanol dapat memberikan aktivitas antimikroba terhadap bakteri <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i> , dan <i>S. thyposa</i>	Fadhilah, 2012

Penelitian antioksidan daun sirsak juga telah dilakukan, beberapa diantaranya dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Beberapa penelitian tentang antioksidan daun sirsak

Hasil penelitian	Referensi
Ekstrak memiliki tingkat aktivitas antioksidan yang bervariasi sesuai area budidaya.	Najmuddin, <i>et al.</i> , 2017
Ekstrak n-heksana menunjukkan sifat antioksidan dengan membersihkan radikal DPPH dengan IC50 sebesar 342,44 µg / mL.	Lawal, <i>et al.</i> , 2017
Ekstrak memiliki aktivitas antioksidan dengan IC50 sebesar 6,23 ppm.	Kurniasih, 2015
Ekstrak etanol dan air daun sirsak memiliki aktifitas antioksidan.	Gavamukulya, <i>et al.</i> , 2014
Ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC50 sebesar 11,46±0,04 yang tergolong antioksidan kuat.	Saraswaty, 2013

## B. Uraian Tentang Kitosan

### 1. Tinjauan umum kitosan

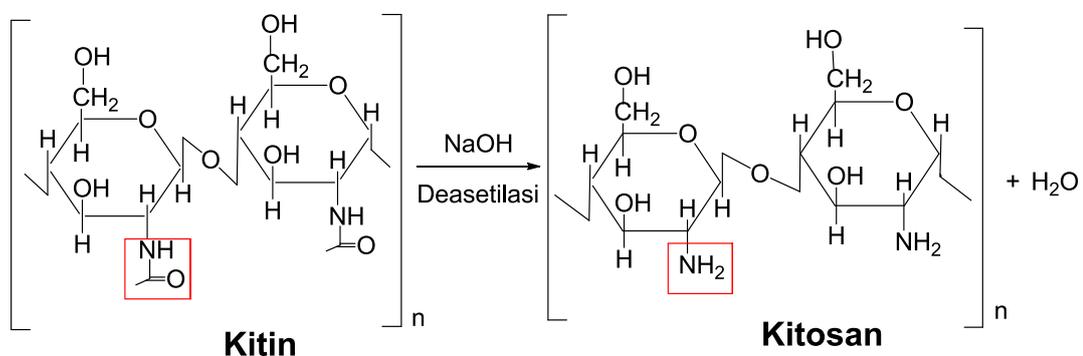
Kitosan merupakan senyawa turunan kitin yang kali pertama ditemukan oleh C. Raughet pada tahun 1895 dengan cara memasak kitin dengan basa. Perkembangan penggunaan kitosan meningkat pada tahun 1940-an sedangkan penggunaan kitosan pada aplikasi khusus, seperti bidang farmasi dan kesehatan dimulai pada pertengahan 1980-1990 (Muzzarelli, *et al.*, 2012).

Kitosan adalah suatu polisakarida yang diperoleh dari hasil deasetilasi kitin, yang umumnya berasal dari limbah kulit hewan *Crustacea*, seperti kulit kepiting, rajungan, kerang dan udang. Kitosan memiliki sifat relatif lebih reaktif dari kitin dan mudah diproduksi dalam bentuk serbuk, pasta, film, serat. Kitosan merupakan bahan bioaktif dan aktivitasnya dapat diaplikasikan dalam bidang farmasi, pertanian, lingkungan dan industri. Kitosan sebagai bahan bioaktif dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Agustina, dkk., 2015) dan bahkan dapat membunuh bakteri dengan jalan merusak membran sel (Sarwono, 2010).

Aktivitas antibakteri kitosan dari ekstrak kulit udang dapat menghambat bakteri pembusuk pada makanan lokal yang mengandung bakteri patogen. Muatan positif kitosan diperkirakan dapat berinteraksi dengan permukaan sel bakteri yang bermuatan negatif, sehingga dapat mengganggu pertumbuhan bakteri (Wulandari, 2008).

Kitosan berbentuk padatan amorf berwarna putih kekuningan, bersifat polielektrolit. Umumnya larut dalam asam organik, pH sekitar 4–6,5, tidak larut pada pH yang lebih rendah atau lebih tinggi. Kelarutan dipengaruhi oleh bobot molekul dan derajat deasetilasi (Natsir dkk., 2010).

Kitosan diperoleh melalui proses deasetilasi kitin yang dapat dilakukan secara kimiawi ataupun enzimatik, reaksi kimianya dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Proses deasetilasi kitin menjadi kitosan (Carvalho *et al.*, 2015)

Variasi waktu dan lama perendaman alkali terhadap kitin dapat menghasilkan kitosan dengan derajat deasetilasi yang berbeda-beda (Emmawati, dkk. 2007). Derajat deasetilasi (DD) kitosan merupakan salah satu sifat kimia yang menentukan jumlah muatan gugus amina bebas dalam polisakarida. Semakin banyak gugus amina bebas maka kitosan semakin murni (Alvarenga, 2011; Kumiriska, dkk., 2011). Kitin dengan DD 75% dikenal sebagai kitosan. DD dapat mempengaruhi karakteristik kitosan dalam aplikasinya.

Aplikasi kitosan sangat banyak, diantaranya berguna sebagai antikoagulan, antitumor, antivirus, penambahan dalam obat pembuluh darah-kulit dan ginjal sintetis, bahan pembuat lensa kontak, aditif pada

kosmetik, membran dialisis, bahan shampoo dan kondisioner rambut, penstabil liposom, bahan ortopedik, pembalut luka dan benang bedah yang mudah diserap, serta mempertinggi daya kekebalan, dan antiinfeksi (Sugita, 2009).

Beberapa sifat dan pemanfaatan kitosan antara lain dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Sifat-sifat dan pemanfaatan kitosan (Sarwono, 2010)

Sifat-sifat	Pemanfaatan
<b>Kationik :</b> Polielektrolit linier bermuatan tinggi Mengklat ion logam beracun	Pemurnian air Flokulan yang baik
<b>Kimiawi :</b> Berat molekul tinggi Gugus amino dan hidroksil	Viskositas tinggi, film Modifikasi kimia
<b>Biologis :</b> Biokompatibel, biodegradabel Non-toksik, film pengemas	Bioaktivitas Antimikroba, antitumor
<b>Farmasi :</b> Biokompatibel, biodegradable	Penyembuh luka, pelepasan obat, kulit sintesis, kontak lensa
<b>Umum-kosmetik :</b> Pelembab, pakan, penyalut, pelindung	Produk perawatan kulit, perawatan/pemeliharaan rambut
<b>Makanan dan Pertanian:</b> Pengikat ion (asam empedu atau asam lemak)	Penurun kolesterol, antikanker, serat pangan, anti luka
<b>Fungistatik Bakteriologis:</b> Adsorben	Meningkatkan produksi bahan penjerat

Derajat deasetilasi (DD) bergantung pada metode pemurnian dan kondisi reaksi. Metode yang dapat dipakai untuk penentuan DD diantaranya tes ninhidrin, titrasi potensiometri linier, spektroskopi NMR,

spektroskopi FTIR, dan turunan spektroskopi UV. Pengukuran gugus fungsi pada DD menggunakan spektroskopi FTIR ditentukan dengan metode *base-line*. Metode ini berdasarkan perbandingan nilai absorbansi pita serapan dari spektrum inframerah dengan rentang bilangan gelombang 4000-400  $\text{nm}^{-1}$  (Sugita, 2009).

Gugus fungsi yang karakteristik dari spektra FTIR kitin dan kitosan dapat dilihat pada Tabel 5 (Domsay dan Robert, 1985).

**Tabel 5.** Serapan FTIR karakteristik untuk kitin dan kitosan

Jenis vibrasi	Bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	Kitin	Kitosan
OH <i>stretching</i>	3500	3450, 3340
NH (-NH <sub>2</sub> ) <i>stretching</i>	-	3400
NH (-NHCOCH <sub>3</sub> ) <i>stretching</i>	3265, 3100	-
CH (CH <sub>3</sub> ) <i>stretching</i>	2961 (lemah)	-
CH (-CH <sub>2</sub> -) <i>stretching asym</i>	2928	2926
CH (-CH <sub>2</sub> -) <i>stretching sym</i>	2871	2864
C=O (-NHCOCH <sub>3</sub> -) <i>stretching</i>	1655	1650 (lemah)
NH (-NHCOCH <sub>3</sub> -) <i>bending</i>	1560	-
CN (-NHCOCH <sub>3</sub> -) <i>stretching</i>	1310	-
NH (R-NH <sub>2</sub> ) <i>bending</i>	-	1596
CN <i>stretching</i>		1200-1020
CH (-CH <sub>2</sub> -) <i>bending asym</i>	1426	1418
CH (-CH <sub>2</sub> -) <i>bending sym</i>	1378	1377
C-O (-C-O-C-) <i>stretching asym</i>	1077	1082
C-O (-C-O-C-) <i>stretching sym</i>	1024	1033

## 2. Sifat fisika-kimia kitosan

Kitosan terdiri atas sakarida-sakarida 2-amino-2-deoksi-D-glukosa yang terikat melalui ikatan 1-4  $\beta$  glikosidik dengan rumus  $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4)_n$ . Kitosan adalah kitin yang terdeasetilasi sebanyak mungkin dengan derajat deasetilasi antara 80-90% (Hargono, 2008). Pada umumnya polisakarida

alami seperti selulosa, dekstrin, pektin, alginat, agar-agar, karagenan bersifat netral atau sedikit asam, sedangkan kitin dan kitosan bersifat basa (Kumari dan Dutta, 2010).

Sifat fisik yang khas dari kitosan yaitu mudah dibentuk menjadi spons, larutan, gel, pasta, membran dan serat. Kitosan berupa padatan amorf yang berwarna putih kekuningan dengan rotasi spesifik  $[\alpha]_D^{11-3}$  hingga  $-10$  (pada konsentrasi asam asetat 2%). Kitosan dapat larut pada kebanyakan larutan asam organik pada pH sekitar 4,0, tetapi tidak larut pada pH lebih besar dari 6,5 juga tidak larut dalam pelarut alkohol, air dan aseton (Hargono, 2008; Sugita dkk., 2009).

Kitosan larut dalam asam mineral pekat seperti HCl dan HNO<sub>3</sub> pada konsentrasi 0,15-1,1%, tetapi tidak larut pada konsentrasi 10%. Kitosan tidak larut dalam H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pada berbagai konsentrasi, sedangkan dalam H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> tidak larut pada konsentrasi 1% sementara pada konsentrasi 0,1% sedikit larut. Kelarutan kitosan dipengaruhi oleh bobot molekul, derajat deasetilasi dan rotasi spesifiknya yang beragam bergantung pada sumber dan metode isolasi serta transformasinya (Sugita, dkk., 2009). Kelarutan kitosan dalam berbagai asam dapat dilihat pada Tabel 6.

Data secara umum spesifikasi kitosan niaga dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 6.** Spesifikasi kitosan niaga (Sugita, dkk., 2009)

Parameter	Ciri
Ukuran partikel	Serpihan sampai bubuk
Kadar air (%)	$\leq 10,0$
Kadar abu (%)	$\leq 2,0$
Warna larutan	Tidak berwarna
Derajat deasetilasi (%)	$\geq 70,0$
Kelas viskositas (cps) :	
- Rendah	$< 200$
- Medium	200-799
- Tinggi pelarut organik	800-2000
- Sangat tinggi	$> 2000$

### 3. Penelitian terkait antibakteri dan antioksidan pada kitosan

Berbagai penelitian mengenai kitosan sebagai sumber antioksidan dan antibakteri mengalami perkembangan. Beberapa diantaranya dapat dilihat pada Tabel 7.

**Tabel 7.** Penelitian tentang antibakteri dan antioksidan kitosan

Hasil penelitian	Referensi
Sampel kitosan memiliki kemampuan sebagai agen antioksidan dengan nilai DPPH ( $41,0 \pm 1 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) dan juga memiliki sifat antibakteri pada <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>B. fragilis</i> , <i>Vibrio cholerae</i> dan <i>Shigella dysenteriae</i> .	Gumgumjee, <i>et al.</i> , 2018
Sampel kitosan berpotensi sebagai antibakteri dalam menghambat pertumbuhan <i>S.epidermidis</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>Propionibacterium agnes</i> dan <i>E.coli</i> pada konsentrasi kitosan 7% b/v.	Suherman, 2018
Konsentrasi larutan nanopartikel kitosan 0,5 ppm, 5 ppm, 50 ppm, 250 ppm dan 500 ppm dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji.	Melia, 2017
Sampel kitosan memiliki aktivitas antimikroba pada pengujian antibakteri diperoleh pada konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% terhadap 10 spesies bakteri dan jamur dan aktivitas antioksidan berkisar antara 18,08% hingga 55,56% pada berbagai konsentrasi (0,1 hingga 10 mg / ml).	Prabu dan Natarajun, 2012
Kompleks kitosan–monosakarida memiliki aktivitas antioksidan kuat yang ditentukan dengan metode DPPH yaitu sebesar 92 – 131 ppm dan daya reduksi 1,059 - 1,274.	Sari, dkk., 2013

Kitosan dapat berfungsi sebagai antibakteri karena mempunyai muatan positif yang kuat yang dapat mengikat muatan negatif dari senyawa lain atau berperan sebagai detoksifikasi, menghambat pertumbuhan bakteri, serta mudah mengalami degradasi secara biologis dan tidak beracun (Kaho dalam Sarwono, 2010).

**Tabel 8.** Konsentrasi minimum (KM) dari kitosan yang mampu menghambat beberapa mikroorganisme (Sarwono, 2010)

Organisme	KM (ppm)	Organisme	KM (ppm)
<b>Gram negative</b>			
<i>Escherichia coli</i>	20	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
	100		100
	468		>800
	650		700
	1000		>1250
<i>Xanthomonas campestris</i>	500	<i>Listeria monocytogenes</i>	150
<i>Salmonella enterica</i>	2000		250
	3000		800
<i>Salmonella typhimurium</i>	>1000	<i>Candida albicans</i>	250
	1500	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<1000
	2000		2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>200	<i>Lactobacillus brevis</i>	>1000
	1700	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1000		
<i>Shigella dysenteriae</i>	>200	<b>Fungi</b>	
<i>Vibrio cholera</i>	200	<i>Aspergillus fumigatus</i>	>2000
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	150	<i>Aspergillus parasiticus</i>	>2000
	1000	<i>Fusarium oxysporum</i>	100
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	250	<i>Botrytis cinerea</i>	10
	500	<i>Byssosclamyces spp.</i>	1000-1500
	~1000	<i>Candida albicans</i>	500
			600
			>1250
<i>Enterobacter aerogenes</i>	250		
<b>Gram Positif</b>			
<i>Bacillus cereus</i>	<1000	<i>Drechslera sorokiana</i>	10
		<i>Microsporium canis</i>	1100
	1000	<i>Trichopyton mentagrophytes</i>	2200
<i>Bacillus megaterium</i>	8000		

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi keaktifan kitosan terhadap mikroba, meliputi sifat-sifat intrinsik maupun ekstrinsik kitosan. Pada tingkat polimerisasi kitosan, kitosan dengan molekul rendah akan lebih aktif. Makin tinggi tingkat asetilasi dari kitosan makin aktif terhadap antibakterinya dengan memecah dinding sel dari mikroba sehingga tidak berkembang dan mati (Sarwono, 2010).

Mekanisme yang berlaku dimana kitosan bersifat anti mikroba karena kitosan berbentuk membran berpori yang dapat menyerap air, sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Disamping itu kitosan mempunyai gugus fungsional amina ( $-NH_2$ ) yang bermuatan positif sangat kuat yang dapat menarik molekul asam amino bermuatan negatif pembentuk protein dalam mikroba. Gugus fungsional amina juga memiliki pasangan elektron bebas sehingga dapat menarik mineral  $Mg^{2+}$  yang terdapat pada ribosom dan mineral  $Mg^{2+}$  yang terdapat pada dinding sel mikroba membentuk ikatan kovalen koordinasi. Hal tersebut menjadikan kitosan dapat mengakibatkan timbulnya kebocoran konstituen intraseluler sehingga mikroba tersebut akan mati (Sarwono, 2010).

### **C. Uraian Tentang Nanokitosan**

Nanokitosan adalah kitosan yang memiliki partikel yang berbentuk padat dengan ukuran 1-100 nm. Kitosan dalam bentuk nanopartikel bersifat netral, tidak toksik, dan memiliki stabilitas yang konstan. Tujuan utama dalam melakukan rancangan nanopartikel adalah untuk mengatur ukuran partikel, sifat-sifat permukaan, dan pelepasan zat aktif pada tempat

yang spesifik di dalam tubuh sebagai sasaran pengobatan (Mohanraj dan Chen, 2006). Selain itu menurut Abdassah (2017), nanopartikel bertujuan untuk mengatasi kelarutan zat aktif yang sukar larut, memperbaiki bioavailabilitas yang buruk, memodifikasi sistem penghantaran obat, meningkatkan stabilitas zat aktif dan memperbaiki absorpsi suatu senyawa makromolekul, dan mengurangi efek iritasi zat aktif pada saluran cerna. Kelebihan nanopartikel adalah kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel yang dapat ditembus oleh partikel koloidal.

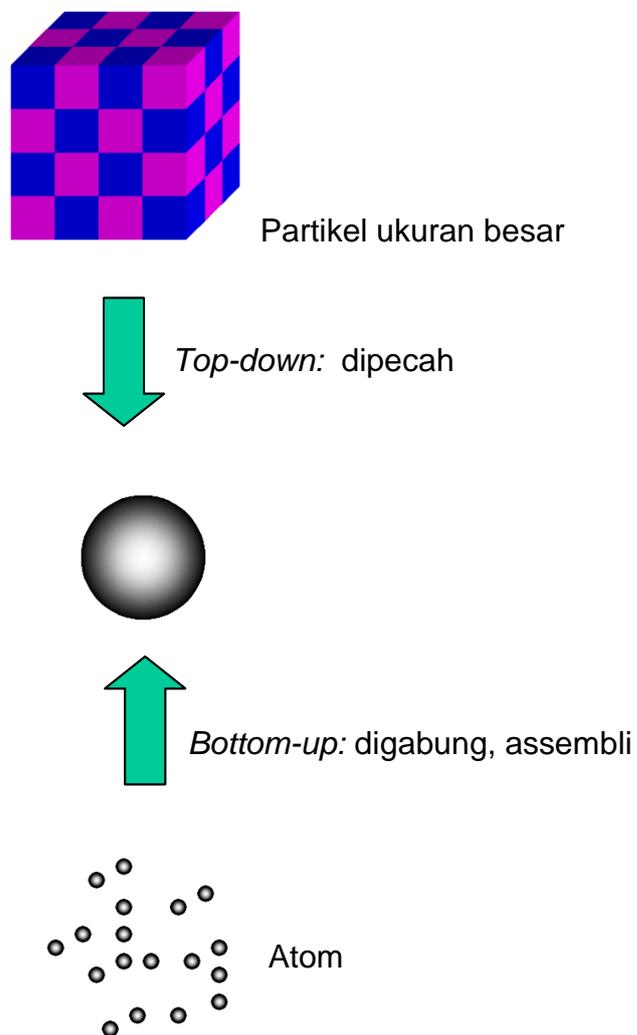
Pembuatan nanopartikel dapat diklasifikasikan secara luas menjadi dua kategori yaitu proses *top-down* dan *bottom up*.

### **1. Proses *top-down***

Proses *top-down* adalah sintesis nanopartikel dengan cara memecah partikel ukuran besar menjadi partikel berukuran nanometer dengan menggunakan teknik penggilingan yang bervariasi seperti penggilingan media, mikrofluidisasi dan homogenisasi tekanan tinggi. Tidak ada pelarut keras yang digunakan dalam teknik ini. Walaupun demikian, semua proses penggilingan media membutuhkan energi yang tinggi dan tidak efisien. Pertimbangan terhadap banyaknya panas yang dihasilkan dalam metode ini membuat pengolahan material yang termolabil menjadi sulit (Patravale, 2004).

## 2. Proses *bottom-up*

Proses *bottom-up* adalah pembentukan nanopartikel dari atom-atom atau molekul-molekul. Pada pendekatan *bottom-up*, zat dilarutkan dalam pelarut organik dan kemudian diendapkan pada penambahan antisolvent dalam adanya stabilizer (Patravale, 2004).

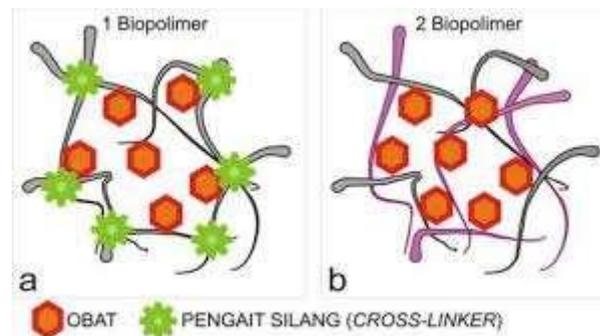


**Gambar 3.** Sintesis nanopartikel: *top-down* dan *bottom-up* (Abdullah dkk, 2008)

Banyak penelitian difokuskan untuk membuat nanopartikel dari polimer yang *biodegradable* seperti kitosan, gelatin, dan sodium alginat. Metode yang paling umum dalam pembuatan nanopartikel melalui proses gelasi ionik yaitu dengan mencampurkan polimer kitosan dengan polianion sodium tripolifosfat yang menghasilkan interaksi antara muatan positif pada gugus amino kitosan dengan muatan tripolifosfat. Tripolifosfat (TPP) dianggap sebagai zat pengikat silang yang paling baik karena TPP memiliki rapat muatan negatif yang tinggi sehingga interaksi dengan polikationik kitosan akan lebih besar (Mohanraj dan Chen, 2006).

Peran TPP sebagai zat pengikat silang akan memperkuat matriks nanopartikel kitosan. Dengan semakin banyaknya ikatan silang yang terbentuk antara kitosan dan TPP maka kekuatan mekanik matriks kitosan akan meningkat sehingga partikel kitosan menjadi semakin kuat dan keras, serta semakin sulit untuk terpecah menjadi bagian-bagian yang lebih kecil (Wahyono dalam Mohanraj dan Chen, 2006).

Terbentuknya nanopartikel kitosan dengan metode gelasi ionik memiliki banyak keuntungan, diantaranya partikulat terbentuk di bawah kondisi sederhana, ukuran dapat disesuaikan, dapat dikontrol dengan mudah, dan memiliki kapasitas baik untuk berasosiasi dengan makromolekul pada komposisi partikel (Milloti dan Bernkop dalam Fatahu, 2015). Ilustrasi matriks yang terbentuk dengan gelasi ionik dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Ilustrasi matriks nanopartikel dengan metode gelasi ionik (Martien, 2012)

#### D. Uraian Tentang Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa atau kelompok senyawa yang dapat mematikan atau menghambat pertumbuhan bakteri. Antibakteri bermanfaat untuk mengendalikan pertumbuhan dan kontaminasi oleh bakteri yang dapat menginfeksi manusia, hewan, serta tanaman dan mengendalikan bakteri yang dapat mencemari makanan dan merusak berbagai bahan seperti kain (tekstil), kulit, struktur berkayu seperti pilar jembatan, insulasi listrik yang terbuat dari plastik serta bahan-bahan organik lainnya (Pleczar dan Chan, 1988).

Mekanisme penghambatan antibakteri dapat dikelompokkan menjadi lima, yaitu menghambat sintesis dinding sel bakteri, merusak keutuhan dinding sel, menghambat sintesis protein sel, menghambat sintesis asam nukleat, dan merusak asam nukleat sel bakteri (Pelczar, 2008).

Menurut Madigan, dkk (2008), berdasarkan sifat toksisitas selektifnya, senyawa antibakteri mempunyai 3 macam efek terhadap pertumbuhan bakteri yaitu:

- a. Bakteriostatik memberikan efek dengan cara menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh. Senyawa bakterostatik seringkali menghambat sintesis protein atau mengikat ribosom. Hal ini ditunjukkan dengan penambahan antibakteri pada kultur bakteri yang berada pada fase logaritmik. Setelah penambahan zat antibakteri pada fase logaritmik didapatkan jumlah sel total maupun jumlah sel hidup adalah tetap.
- b. Bakteriosidal memberikan efek dengan cara membunuh sel tetapi tidak terjadi lisis sel atau pecah sel. Hal ini ditunjukkan dengan penambahan antibakteri pada kultur bakteri yang berada pada fase logaritmik. Setelah penambahan zat antibakteri pada fase logaritmik didapatkan jumlah sel total tetap sedangkan jumlah sel hidup menurun.
- c. Bakteriolitik menyebabkan sel menjadi lisis atau pecah sel sehingga jumlah sel berkurang atau terjadi kekeruhan setelah penambahan antibakteri. Hal ini ditunjukkan dengan penambahan antibakteri pada kultur bakteri yang berada pada fase logaritmik. Setelah penambahan zat antibakteri pada fase logaritmik, jumlah sel total maupun jumlah sel hidup menurun.

Daya antibakteri diukur secara *in vitro* dengan metode pengenceran dan metode difusi. Metode difusi dilakukan dengan

mengukur diameter zona bening (*clear zone*) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak (Jawetz, 2001).

Schunack, dkk (1990) membedakan bakteri berdasarkan morfologi dan pemanfaatan kemoterapi menjadi dua, yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Kedua bakteri dapat dibedakan berdasarkan pewarnaan Gram. Warna ungu menandakan bakteri Gram positif dan warna merah menandakan Gram negatif. Bakteri yang sering menyebabkan penyakit yang menginfeksi manusia diantaranya *Staphylococcus aureus* yang tergolong bakteri Gram positif dan *Eschericia coli* tergolong bakteri Gram negatif (Pleczar dan Chan, 1988).

### **E. Uraian Tentang Antioksidan**

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga mampu menetralkan peningkatan radikal bebas, melindungi sel dari efek toksik yang dihasilkan serta berkontribusi dalam pencegahan penyakit-penyakit (Winarsih H., 2007).

Antioksidan dapat membantu melindungi tubuh manusia melawan kerusakan yang disebabkan oleh senyawa oksigen reaktif (ROS; *Reactive Oxygen Species*) dan radikal bebas lainnya. Selain itu, antioksidan mampu memperkecil terjadinya proses oksidasi dari lemak dan minyak, memperkecil terjadinya proses kerusakan dalam makanan,

memperpanjang masa pemakaian dalam industri makanan, meningkatkan stabilitas lemak yang terkandung dalam makanan serta mencegah hilangnya kualitas sensori dan nutrisi (Winarsi, 2007; Hanani, dkk., 2005).

Secara alami sistem antioksidan tubuh sebagai mekanisme perlindungan terhadap serangan radikal bebas, telah ada didalam tubuh. Akan tetapi kemampuan untuk menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh ada batasnya. Sebagai contoh, tubuh manusia dapat menghasilkan *glutathione*, salah satu antioksidan yang sangat kuat. Namun, untuk memicu tubuh menghasilkan *glutathione*, tubuh memerlukan asupan vitamin C sebesar 1.000 mg (Sayuti dan Yenrina, 2015).

Tubuh manusia memiliki sistem oksidan untuk menangkal reaktivitas radikal bebas, yang secara kontinu dibentuk sendiri oleh tubuh. Bila jumlah senyawa oksigen reaktif ini melebihi jumlah oksidan dalam tubuh, kelebihanannya akan menyerang komponen lipid, protein, maupun DNA sehingga mengakibatkan kerusakan-kerusakan yang disebut stres oksidatif. Namun demikian, reaktivitas radikal bebas dapat dihambat melalui tiga cara, yaitu (1) mencegah atau menghambat pembentukan radikal bebas baru, (2) menginaktivasi atau menangkap radikal dan memotong propagasi (pemutusan rantai), (3) memperbaiki (*repair*) kerusakan oleh radikal (Winarsi, 2007).

Antioksidan dapat berupa enzim (seperti katalase dan glutation peroksidase), vitamin (vitamin E, C, A, dan  $\beta$ -karoten), dan senyawa lain

(flavonoid, albumin, bilirubin dan seruloplasmin). Antioksidan enzimatis merupakan sistem pertahanan utama (primer) terhadap kondisi stres oksidatif. Disamping antioksidan yang bersifat enzimatis, ada juga antioksidan non-enzimatis yang dapat berupa senyawa nutrisi maupun non nutrisi. Kedua kelompok antioksidan non-enzimatis ini disebut antioksidan sekunder karena dapat diperoleh dari asupan bahan makanan, seperti vitamin C, E, A, dan  $\beta$ -karoten. Glutation, asam urat, bilirubin, albumin, dan flavonoid juga termasuk dalam kelompok ini. Senyawa tersebut berfungsi menangkap senyawa oksidan serta mencegah terjadinya reaksi berantai (Winarsi, 2007).

Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat atau memperlambat kerusakan akibat proses oksidasi (Sayuti dan Yenrina, 2015; Winarti, 2010).

Mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidasi atau menghentikan reaksi berantai pada radikal bebas dari lemak yang teroksidasi, dapat disebabkan oleh 4 (empat) macam mekanisme reaksi menurut (Sayuti dan Yenrina, 2015), yaitu:

- a. pelepasan hidrogen dari antioksidan
- b. pelepasan elektron dari antioksidan
- c. adisi asam lemak ke cincin aromatik pada antioksidan.
- d. pembentuk senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan.

Mekanisme kerja antioksidan primer adalah dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru atau mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi lebih stabil dan kurang reaktif dengan cara memutus reaksi berantai (polimerisasi) atau dikenal dengan istilah juga *chain breaking antioxidant*. Sedangkan mekanisme kerja antioksidan sekunder adalah dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkap radikal bebas (*free radical scavenger*). Akibatnya radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler. Antioksidan sekunder terdiri dari antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami banyak ditemukan dalam sayuran dan buah-buahan. Komponen yang terkandung didalam antioksidan alami ini adalah vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -karoten, flavonoid, isoflavon, flavon, antosianin, katekin, isokatekin, asam lipoat, bilirubin dan albumin, likopen dan klorofil (Winarsi, 2007).

Metode pengujian aktivitas antioksidan yang paling umum digunakan adalah dengan menggunakan *2,2-difenil-1-pikrilhidrazil* (DPPH). DPPH adalah senyawa radikal bebas yang stabil. Menurut Nishizawa dkk (2005) bahwa DPPH telah diketahui manfaatnya sebagai penentuan aktivitas antioksidan untuk menguji aktivitas antioksidan radikal dari vitamin yang bersifat antioksidatif dan komponen aromatik polihidroksil (Sayuti dan Yenrina, 2015).

DPPH merupakan radikal bebas stabil berwarna ungu yang digunakan secara luas untuk pengujian kemampuan penangkapan radikal

bebas dari beberapa komponen alam seperti komponen fenolik. Metode DPPH berfungsi untuk mengukur elektron tunggal seperti transfer hidrogen sekaligus juga untuk mengukur aktivitas penghambatan radikal bebas dengan reaksi pada persamaan 1:



Metode DPPH merupakan pengukuran antioksidan yang memiliki keunggulan dibandingkan metode lain yaitu sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Prinsip dari metode uji aktivitas antioksidan ini adalah pengukuran aktivitas antioksidan secara kuantitatif yaitu dengan melakukan pengukuran penangkapan radikal DPPH oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis sehingga akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  (*Inhibitory Concentration*). Nilai  $\text{IC}_{50}$  didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat meredam radikal bebas sebanyak 50 %. Semakin kecil nilai  $\text{IC}_{50}$  maka aktivitas peredaman radikal bebas semakin tinggi (Menurut (Blois, 1958) dalam Hanani, dkk., 2005; Molyneux, 2004). Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu menjadi kuning.

Menurut Andayani (2008), Persentase hambatan radikal bebas ditentukan dengan rumus pada persamaan 2:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol}) - (\text{Absorbansi Sampel})}{(\text{Absorbansi kontrol})} \times 100 \% \quad (2)$$

Keterangan:

- *Abs. Kontrol: serapan radikal DPPH*
- *Abs. Sampel: serapan sampel dalam radikal DPPH*

Nilai konsentrasi efektif merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (mikrogram/mililiter) yang mampu menghambat 50% oksidasi (Tristantini, dkk., 2017). Tingkat kekuatan antioksidan berdasarkan nilai IC<sub>50</sub> terlihat pada Tabel 9.

**Tabel 9.** Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH (Ciptaningsih, 2012)

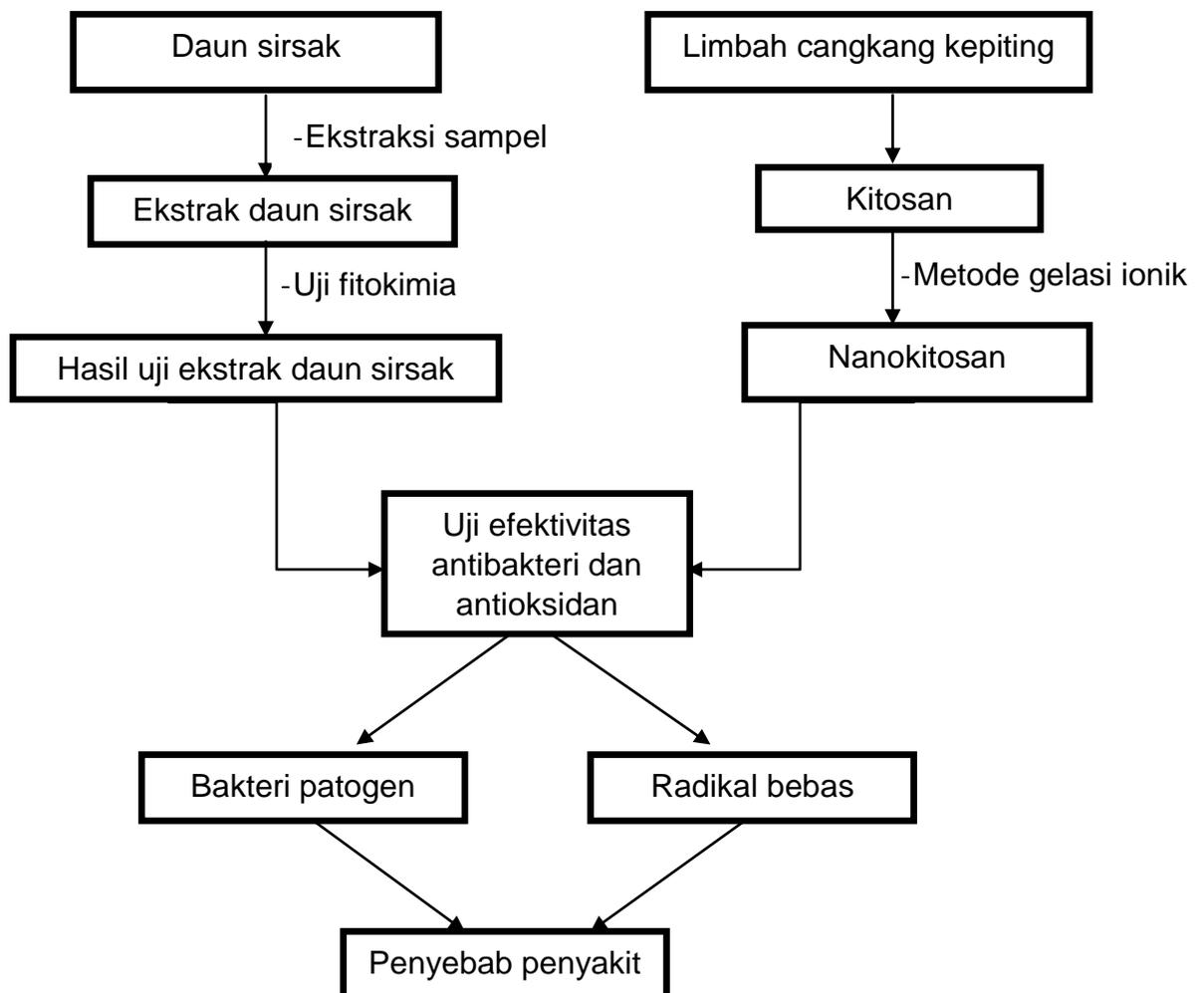
<b>Intensitas</b>	<b>Nilai IC<sub>50</sub></b>
Sangat aktif	, 50 ppm
Aktif	50-100 ppm
Sedang	101-250 ppm
Lemah	250-500 ppm

## F. Kerangka Konseptual

Sirsak (*A.muricata L.*) merupakan salah satu tanaman spesies family *Annonaceae* yang telah lama dimanfaatkan bagi kesehatan di tanah air dan di berbagai Negara, baik yang diperoleh dari daging buah, daun maupun bijinya. Daun sirsak mengandung senyawa asetogenin yang memiliki banyak manfaat yaitu sebagai antikanker, antitumor, anti-inflamasi, antidepresi, antivirus, antibakteri dan antioksidan. Ekstrak etanol, methanol, etil-asetat dan n-heksan daun sirsak ditemukan bersifat aktif terhadap bakteri dan jamur seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*. Selain itu, ekstrak etanol, air dan n-heksana dari daun sirsak juga menunjukkan sifat antioksidan dengan membersihkan radikal DPPH, sehingga dapat berperan sebagai penangkal utama radikal bebas, oksidasi asam nukleat, protein, lemak, dan DNA dengan cara mengikat radikal bebas atau molekul reaktif lainnya.

Selain daun sirsak yang memiliki efektivitas antioksidan dan antibakteri yang potensial, penelitian lainnya yang mengalami perkembangan sebagai sumber antioksidan dan antibakteri adalah kitosan. Kitosan adalah suatu polisakarida yang diperoleh dari hasil deasetilasi kitin, yang umumnya berasal dari limbah kulit hewan *Crustacea*. Aplikasi kitosan yang diterapkan dalam berbagai bidang industri modern mendorong para peneliti dan praktisi industri untuk terus mengembangkannya dalam berbagai penelitian, termasuk melakukan

modifikasi kitosan mencakup perubahan ukuran partikel ke bentuk nano-partikel. Nano-partikel kitosan mempunyai keunggulan antara lain meningkatkan kelarutan senyawa atau zat aktif kitosan, mengurangi dosis pengobatan dan meningkatkan absorpsi obat dari kitosan.



**Gambar 5.** Kerangka konseptual

## G. Hipotesis

Berdasarkan beberapa hal yang telah diuraikan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah :

1. Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) memiliki senyawa metabolit sekunder yang efektif sebagai antibakteri dan antioksidan.
2. Karakteristik nanokitosan yang diperoleh berupa serbuk halus putih kekuningan dengan ukuran partikel kurang dari 100 nm.
3. Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dan nanokitosan memiliki aktivitas antibakteri dan antioksidan.
4. Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) yang difortifikasi nanokitosan memiliki aktivitas antibakteri dan antioksidan.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Februari sampai Juli 2019 di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Kimia Terpadu Fakultas MIPA dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

#### **B. Alat dan Bahan Penelitian**

##### **1. Alat penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah alat-alat gelas laboratorium, timbangan analitik, oven, blender, bejana maserasi, rotary evaporator, Transmission Electron Microscope (TEM) HR 7700, Fourier-Transform Infrared (FTIR) Prestige-21, X-Ray Diffraction (XRD) Maxima (Shimadzu), spektrometer UV-Vis, inkubator, autoclaf, oven, rotavapor, magnetik stirer, *spray dryer* B-290, hotplate dan micropipet.

##### **2. Bahan penelitian**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah daun sirsak (*Annona muricata L.*), kitosan, natrium hidroksida (NaOH), asam klorida (HCl), aquadest (H<sub>2</sub>O), asam asetat (CH<sub>3</sub>COOH) 0,3%, twin 0,1%, natrium tripoliposfat 0,1%, metanol (CH<sub>3</sub>OH), magnesium (Mg) serbuk, asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), kloroform amoniakal, pereaksi

*Dragendorff*, pereaksi *Wagner*, kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), etanol ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), Larutan DPPH, vitamin C atau asam askorbat ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ), media Tryptone Soya Agar (TSA), kloramfenikol, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 dan bakteri *Eschericia coli* ATCC 8739.

### C. Prosedur Penelitian

#### 1. Ekstraksi sampel daun sirsak (*Annona muricata* L.)

Sampel daun sirsak yang diperoleh dari Dusun Limbung, Desa Tambangan, Kab. Bulukumba dibersihkan dan dicuci terlebih dahulu kemudian dikeringkan. Setelah kering, sampel ditimbang dan dipotong kecil-kecil. Sampel yang telah berbentuk potongan-potongan kecil tersebut akan dilanjutkan ke tahap ekstraksi.

Proses ekstraksi mengacu pada Yuliantari, dkk (2017). Ekstraksi sampel dilakukan dengan metode sonikasi. Sebanyak 60 g sampel daun *A. muricata* L. diekstraksi dengan 2040 mL pelarut etanol. Satu kali ekstraksi berlangsung selama 20 menit dengan suhu  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  dan diulang sebanyak empat kali. Setelah selesai proses ekstraksi, semua ekstrak disatukan dan disaring. Pelarut kemudian diuapkan secara vakum dengan menggunakan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental. Bagan kerja terlihat pada Lampiran 1.

## 2. Uji fitokimia ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.)

Uji fitokimia ini mengacu pada Harborne (1996). Uji yang dilakukan meliputi uji flavonoid, alkaloid, saponin, triterpenoid dan steroid.

### a. Uji alkaloid

Timbang sampel kemudian ekstraksi dengan kloroform amoniakal. Saring dan pindahkan ke tabung reaksi A dan B. Pada masing-masing tabung A dan B tambahkan pereaksi Meyer dan pereaksi Wagner. Sampel pada tabung reaksi A positif mengandung alkaloid jika terdapat warna kuning dan pada tabung reaksi B terdapat endapan cokelat putih.

### b. Uji flavonoid

Pengujian flavonoid menggunakan pereaksi Mg serbuk dan amil alkohol, setelah itu dikocok. Sampel positif mengandung flavonoid apabila terdapat buih dan larutan berubah menjadi warna kuning, merah atau cokelat yang sangat mencolok.

### c. Uji Fenolik

Ekstrak sampel ditambahkan anhidrida asetat dan ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  1% sebanyak 2 tetes kemudian dikocok. Sampel positif mengandung fenolik apabila terdapat perubahan warna menjadi biru, hijau, kuning atau jingga.

d. Uji saponin

Ekstrak sampel ditambahkan 10 mL aquabides kemudian dikocok dan dilihat apakah terbentuk buih-buih setelah didiamkan selama 10 menit. Sampel positif mengandung saponin bila terdapat buih dengan intensitas yang banyak dan konsisten selama 10 menit.

e. Uji triterpenoid dan steroid

Ekstrak sampel ditambahkan 2-3 tetes asam asetat anhidrat dan 2-3 tetes asam sulfat pekat. Sampel positif mengandung terpenoid apabila mengalami perubahan warna merah atau coklat dan positif mengandung steroid apabila mengalami perubahan warna biru, ungu atau hijau. Bagan kerja terlihat pada Lampiran 2.

## 2. Pembuatan nanokitosan dengan metode gelasi ionik

Proses pengecilan ukuran (*sizing*) kitosan mengacu pada Suptijah, dkk (2011) yang dimodifikasi. Pembuatan gel kitosan dilakukan dengan melarutkan kitosan sebanyak 20 g dalam 1 L asam asetat 2%. Kemudian disaring untuk menghilangkan partikel pengotor.

Larutan kitosan yang diperoleh selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran (*sizing*) dengan *magnetik stirer* selama 30 menit atau sampai terlihat larutan jernih. Pembentukan nano partikel dilakukan melalui tahap emulsifikasi dengan penambahan 500  $\mu$ L twin 0,1%. Proses *sizing* ini dilanjutkan sampai 1 jam. Setelah itu stabilisasi dilakukan dengan 70 mL larutan natrium tripoliposfat 0,1%, sambil terus diaduk selama 1 jam. Pengeringan dilakukan dengan cara *spray drying*

sehingga diperoleh serbuk nanokitosan yang selanjutnya hasil sintesis diuji karakteristiknya dengan alat instrumentasi FTIR, XRD dan TEM. Bagan kerja terlihat pada Lampiran 3.

### **3. Uji antibakteri ekstrak daun sirsak, nanokitosan dan fortifikasi ekstrak daun sirsak dengan nanokitosan**

Aktivitas antibakteri dilakukan mengikuti prosedur penelitian Wulandari (2008) dengan cara metode difusi cakram kertas. Media agar yang digunakan dalam uji adalah media Muller Hinton Agar (MHA) dan mikroba uji yang digunakan adalah bakteri *Staphylococcus aureus* (gram positif) dan *Eschericia coli* (gram negatif).

#### **1. Preparasi larutan sampel**

Uji aktivitas antibakteri secara in-vitro dilakukan dengan cara satu ose isolate mikroba diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan kedalam tabung yang berisi 2 mL larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan *Mc. Farland*. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap jenis bakteri uji.

Larutan sampel yang akan diujikan dibuat dengan beberapa perlakuan, baik pada daun sirsak, nanokitosan dan fortifikasi daun sirsak dengan nanokitosan. Ekstrak daun sirsak, nanokitosan dan fortifikasi daun sirsak dengan nanokitosan masing-masing 100 mg dilarutkan dalam 1000  $\mu$ l etanol p.a dan 20  $\mu$ L diaplikasikan pada disk kertas cakram.

## 2. Pembuatan Media Mueller-Hinton Agar (MHA)

Pembuatan media MHA dilakukan dengan menimbang sebanyak 38 gram media, lalu ditambahkan 1 liter aquadest kemudian dipanaskan sampai mendidih untuk melarutkan media. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, ditunggu suhu sampai hangat-hangat kuku (45 °C-50 °C). Lalu dituang ke dalam cawan petri steril kemudian disimpan pada suhu 2-8 °C.

## 3. Pengujian antimikroba

Sebanyak  $\pm 50 \mu\text{L}$  inokulum mikroba disebar pada media padat Muller Hinton Agar (MHA) kemudian diratakan sampai kering menggunakan kaca *spreader*. Disk cakram kertas dengan diameter 6 mm dibasahi dengan larutan ekstrak daun sirsak, nanokitosan dan fortifikasi daun sirsak dengan nanokitosan pada berbagai variasi konsentrasi, dengan kontrol positif disk yang mengandung kloramfenikol (30  $\mu\text{g}$ ) dan kontrol negatif berupa disk yang dibasahi etanol. Kemudian diletakkan didalam tiap-tiap cawan petri yang berisi media pada biakan bakteri. Kemudian cawan petri diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dan dilanjutkan hingga 48 jam pada suhu 25 °C. Aktivitas antimikroba ditunjukkan dengan munculnya zona bening disekitar *paper disk*. zona bening yang terbentuk pada masing-masing bakteri uji pada

tiap perlakuan dengan menggunakan jangka sorong. Bagan kerja terlihat pada Lampiran 4.

#### **4. Uji antioksidan ekstrak daun sirsak, nanokitosan dan fortifikasi ekstrak daun sirsak dan nanokitosan**

Uji antioksidan pada ekstrak daun sirsak, nanokitosan dan fortifikasi ekstrak daun sirsak dan nanokitosan dilakukan dengan metode DPPH. Bagan kerja terlihat pada Lampiran 5.

##### **a. Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM**

Larutan DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM dibuat dengan cara menimbang 7,9 mg DPPH dan dilarutkan dengan metanol p.a hingga 50 mL dalam labu ukur.

##### **b. Penentuan panjang gelombang maksimum ( $\lambda$ maks) DPPH**

Larutan blanko dibuat dengan cara memipet 1 mL larutan DPPH kemudian dicukupkan volumenya hingga 5 mL dengan metanol p.a. Selanjutnya, diukur absorbansinya dan ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

##### **c. Pembuatan larutan asam askorbat (pembanding/kontrol positif)**

Asam askorbat ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm sebagai larutan stok. Kemudian dari larutan stok dibuat deret konsentrasi 0,25; 0,5, 1, 2 dan 4  $\mu$ l/mL. Larutan DPPH ditambahkan sebanyak 1 mL ke masing-masing tabung reaksi tersebut, dan dicukupkan volumenya hingga 5 mL dengan

methanol p.a dalam labu ukur. Campuran dibiarkan selama 30 menit. Selanjutnya diukur menggunakan spektrometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum. Kemampuan untuk meredam radikal bebas DPPH (inhibisi) dihitung dengan menggunakan rumus pada persamaan 3.

$$\text{Hambatan aktivitas radikal bebas (\%)} = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times 100\% \quad (3)$$

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Ekstraksi sampel daun sirsak (*Annona muricata* L.)**

Pada penelitian ini telah dilakukan ekstraksi daun sirsak (*A.muricata* L.) dengan menggunakan pelarut etanol 96%, karena etanol 96% dapat bertindak sebagai pelarut dan pengawet sehingga zat yang diinginkan dapat terekstraksi serta tahan lama dan tidak mudah ditumbuhi jamur (Wullur, dkk., 2015). Selain itu, dengan menggunakan pelarut etanol akan menarik senyawa-senyawa yang bersifat polar, seperti alkaloid, flavonoid, fenolik dan asetogenin (Sumantri, dkk., 2014).

Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan ultrasonik. Hal ini karena metode ultrasonik memiliki banyak kelebihan dibandingkan ekstraksi secara termal atau konvensional dan metode maserasi. Diantara keunggulan metode ultrasonik adalah lebih aman, waktu ekstraksi lebih singkat, meningkatkan jumlah rendemen kasar, rendahnya energi dan sedikitnya pelarut yang digunakan (Handayani dan Sriherfyna, 2016), serta menggunakan gelombang ultrasonik yaitu gelombang akustik dengan frekuensi lebih besar dari 16-20 kHz. Kelebihan lainnya menurut Kumoro (2015), dengan menggunakan metode ekstraksi ultrasonik, maka dapat mengeluarkan senyawa organik dan anorganik dari matriks bagian tanaman dengan melibatkan dua fenomena fisik, yaitu difusi melalui

dinding sel bagian tanaman dan pengeluaran isi sel oleh pelarut setelah dinding sel pecah.

Pemilihan metode ekstraksi sangat penting dilakukan karena hasil ekstraksi akan mencerminkan tingkat keberhasilan metode tersebut (Handayani dan Sriherfyna, 2016). Komponen bioaktif seperti flavonoid, alkaloid dan fenol dapat mengalami kerusakan pada suhu di atas 50 °C. Hal ini karena mengalami perubahan struktur serta menghasilkan ekstrak yang rendah, sehingga pada penelitian ini mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Yuliantari, dkk., (2017), menggunakan suhu 45 °C dengan waktu ekstraksi 20 menit yang memperoleh rendemen dan total flavonoid lebih besar.

Ibrahim, *et al.*, (2015) melaporkan peningkatan suhu dan waktu ekstraksi perlu diperhatikan, suhu ekstraksi yang terlalu tinggi dan waktu ekstraksi yang lama serta melampaui batas waktu optimum dapat menyebabkan hilangnya senyawa-senyawa pada larutan karena penguapan, begitu juga sebaliknya jika suhu ekstraksi terlalu rendah akan menyebabkan tidak semua senyawa aktif terekstrak dari bahan dan menghasilkan rendahnya senyawa aktif yang diperoleh.

Metode ekstraksi ultrasonik yang dipilih dilakukan selama 4 kali ekstraksi yang ditandai dengan larutan sudah bening. Hal ini sesuai dengan teori Harborne (1996) yang menyatakan bila ampas saringan pada ekstraksi ulang sama sekali tak berwarna hijau lagi, dapat dianggap semua senyawa bobot molekul rendah telah terekstraksi.

Ekstrak kemudian dievaporasi untuk menguapkan pelarut dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu dibawah 50 °C. Pemakaian evaporator dapat memisahkan pelarut dengan ekstrak digunakan karena dengan evaporasi, pelarut dapat dipisahkan dari ekstrak pada suhu rendah jauh dibawah titik didihnya sehingga senyawa yang mungkin ada dalam ekstrak dengan titik didih yang rendah tidak rusak. Hasil evaporasi ekstrak etanol daun *A. muricata* L. menghasilkan padatan berwarna hijau kehitaman dengan bobot 3,87 g dari 60 g yang diekstraksi.

#### **B. Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)**

Komponen yang terdapat dalam ekstrak daun *A. muricata* L. dianalisis golongan senyawanya dengan uji fitokimia dengan beberapa pereaksi untuk golongan senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid dan steroid, fenolik dan saponin. Pereaksi-pereaksi spesifik yang digunakan kebanyakan bersifat polar sehingga dapat berinteraksi dengan sampel berdasarkan prinsip '*like dissolve like*'. Hasil skrining fitokimia maserat tersebut diperlihatkan pada Tabel 10.

**Tabel 10.** Hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun *A. muricata* L.

Uji	Pereaksi	Hasil uji
Alkaloid	Wagner	(+) alkaloid
	Meyer	(+) alkaloid
Flavonoid	Wilstater	(+) flavonoid
Fenolik	Anhidrida asetat + FeCl <sub>3</sub> 1%	(+) fenolik
Saponin	Aquades	(+) saponin
Steroid	Liebermann-Burchard	(+) steroid
Terpenoid	Liebermann-Burchard	(-) terpenoid

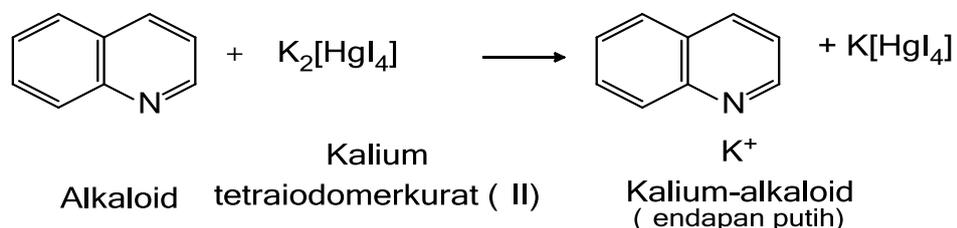
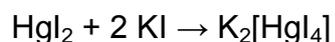
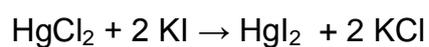
Berdasarkan Tabel 10, ekstrak etanol daun *A. muricata* L. mengandung senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin dan steroid. Pada pengujian fitokimia ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Agu, *et al.*, (2017); Gavamukulya, *et al.*, (2014); Kumar, dkk., (2013) Pathak, dkk., (2010).

Ekstrak kental etanol yang diperoleh diuji pendahuluan terlebih dahulu untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak.

#### a. Uji alkaloid

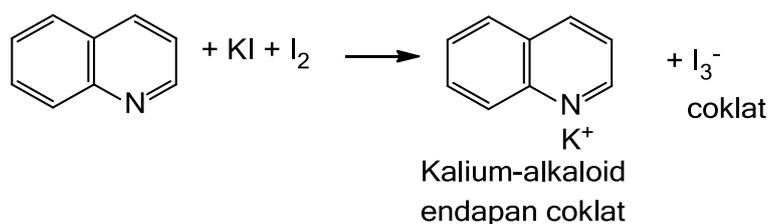
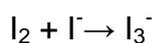
Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekstrak daun *A. muricata* L. memberikan hasil berupa endapan coklat pada uji Meyer dan endapan cokelat putih pada uji Wagner mengindikasikan adanya senyawa alkaloid. Ekstrak sampel mengandung senyawa alkaloid yang umumnya bersifat polar, sehingga senyawa ini kemungkinan besar ada yang terekstrak dalam pelarut polar seperti etanol.

Hasil positif alkaloid pada uji Meyer ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Diperkirakan endapan tersebut adalah kompleks kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Meyer, larutan merkuriem (II) klorida ditambah kalium iodida akan bereaksi membentuk endapan merah merkuriem (II) iodida. Jika kalium iodida yang ditambahkan berlebih maka akan terbentuk kalium tetraiodomerkurat (II) (Svehla, 1990). Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam (McMurry, 2004). Pada uji alkaloid dengan pereaksi Meyer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam  $K^+$  dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Perkiraan reaksi yang terjadi pada uji Meyer pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Reaksi uji Meyer (Risky dan Suyatno, 2014)

Hasil positif alkaloid pada uji Wagner ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Diperkirakan endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Wagner, iodin bereaksi dengan ion  $I^-$  dari kalium iodide menghasilkan ion  $I_3^-$  yang berwarna coklat. Pada uji Wagner, ion logam  $K^+$  akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Reaksi yang terjadi pada uji Wagner yaitu:

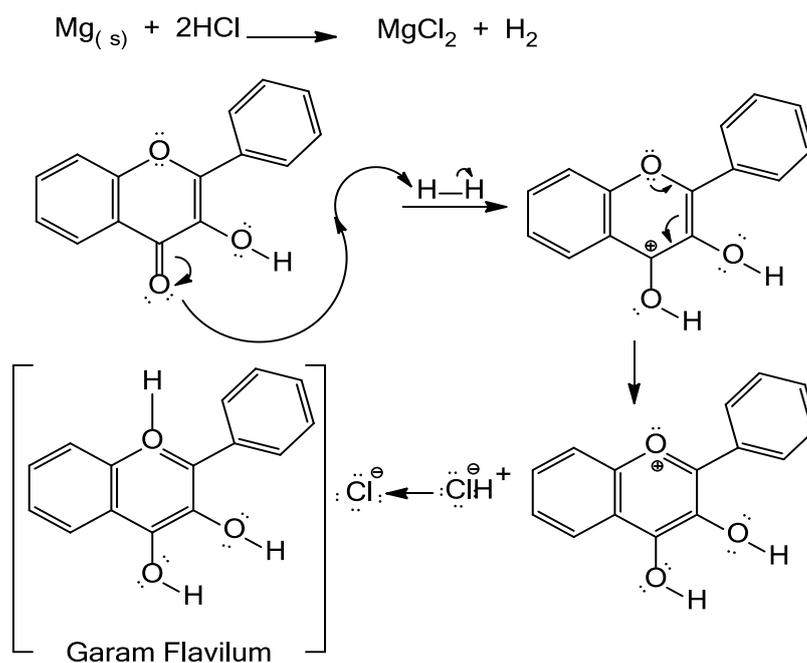


**Gambar 7.** Reaksi uji Wagner (Risky dan Suyatno, 2014)

#### b. Uji Flavonoid, fenolik dan saponin

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekstrak daun *A. muricata* L. mengalami perubahan dari warna hijau menjadi berwarna kuning yang pada uji Wilstater yang mengindikasikan adanya senyawa flavonoid. Magnesium dan asam klorida pada uji Wilstater bereaksi membentuk gelembung-gelembung yang merupakan gas H<sub>2</sub> sedangkan logam Mg dan HCl pekat pada uji ini berfungsi untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terbentuk perubahan warna menjadi merah atau jingga. Jika dalam suatu ekstrak tubuhan terdapat

senyawa flavonoid akan terbentuk garam flavillium saat penambahan Mg dan HCl yang berwarna merah, kuning atau jingga dengan reaksi seperti pada Gambar 8 (Setyowati dkk., 2014). Reaksi yang terjadi dalam uji flavonoid terdapat pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Reaksi uji flavonoid (Setiabudi dan Tukiran, 2017)

Pada uji fenolik, ekstrak etanol daun *A. muricata* L. memberikan reaksi positif yang ditandai dengan ekstrak berubah dari hijau menjadi kuning. Besi (III) klorida yang ditambahkan pada ekstrak etanol daun *A. muricata* L. akan membentuk warna biru, hijau, kuning atau jingga yang menandakan ekstrak termasuk golongan fenolik. Fenolik bereaksi dengan  $\text{FeCl}_3$  1% karena  $\text{FeCl}_3$  bereaksi dengan gugus  $-\text{OH}$  aromatis (Haryati *et al.*, 2015). Kompleks berwarna yang terbentuk diduga sebagai besi (III) heksafenolat. Ion  $\text{Fe}^{3+}$  mengalami hibridisasi orbital  $d^2sp^3$

sehingga ion  $\text{Fe}^{3+}$  ( $4s^03d^5$ ) memiliki 6 orbital kosong yang diisi oleh pendonor pasangan elektron, yaitu atom oksigen pada senyawa fenolik yang memiliki pasangan elektron bebas (Marliana & Saleh, 2011). Menurut Nugrahani, dkk., (2016), reaksi yang terjadi dalam uji fenolik dapat dilihat pada Gambar 9.



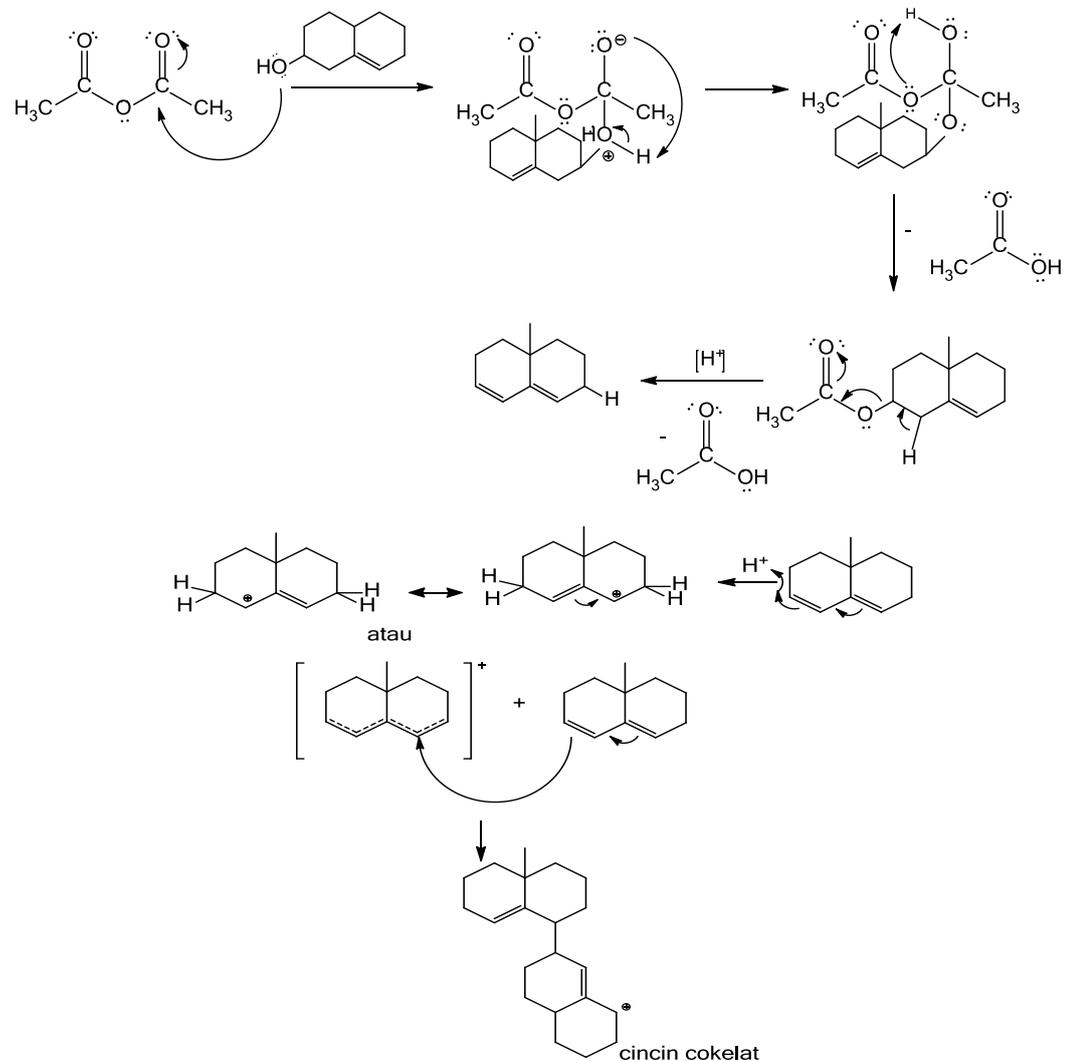
**Gambar 9.** Reaksi uji fenolik (Nugrahani, dkk., 2016)

Uji saponin menunjukkan hasil positif karena terbentuk buih setelah pengocokan dan bertahan lama. Saponin memiliki glikosil sebagai gugus polar serta gugus steroid atau triterpenoid sebagai gugus nonpolar sehingga bersifat aktif permukaan dan membentuk misel saat dikocok dengan air. Pada struktur misel gugus polar menghadap ke luar sedangkan gugus nonpolar menghadap ke dalam dan keadaan inilah yang tampak seperti busa (Sangi, *et al.*, 2008).

### c. Uji Steroid dan Terpenoid

Ekstrak etanol daun *A. muricata* L. memberikan reaksi positif terhadap pereaksi Lieburmann-Buchard yang ditandai dengan ekstrak berubah dari hijau menjadi hijau kebiruan. Hal ini mengindikasikan adanya senyawa steroid yang umumnya bersifat nonpolar sehingga senyawa ini kemungkinan besar terekstrak sedikit dalam pelarut polar seperti etanol.

Reaksi yang terjadi dalam uji terpenoid dan steroid adalah sebagai berikut:



**Gambar 10.** Reaksi terpenoid dan steroid (Setiabudi dan Tukiran, 2017)

### C. Karakteristik Kitosan

Kitosan sebagai biopolimer alam, berbentuk polisakarida linier yang tersusun atas  $\beta$ -(1-4)-linked *D*-glucosamine dan *N*-acetyl-*D*-glucosamine dengan distribusi acak. Kitosan diproduksi melalui

proses deasetilasi senyawa kitin, yakni komponen utama pada cangkang binatang *crustaceae*. Pada penelitian ini menggunakan kitosan dari cangkang kepiting merah *Pharma grade*, yang memiliki keunggulan memiliki aktifitas antibakteri 1,5 x lipat dibandingkan kitosan dari cangkang kepiting biru, *bulk density* yang sangat tinggi berkisar antara 0,7-0,9 gr/cm<sup>3</sup>, memiliki kandungan astaxantin yang lebih tinggi sehingga memiliki sifat antioksidan lebih kuat, viskositas dan berat molekul sangat rendah sehingga memudahkan bereaksi dengan senyawa lain, kestabilannya membuat mudah untuk diaplikasikan lebih luas. Kitosan dari cangkang kepiting merah *Pharma grade* dapat dilihat pada Gambar 11.



**Gambar 11.** Kitosan dari cangkang kepiting merah *Pharma grade* (Dokumentasi pribadi, 2019)

Karakteristik kitosan yang paling penting adalah derajat deasetilasi (DD). Selain itu juga ada analisis kadar air, kadar abu dan warna. Hasil karakterisasi kitosan dapat dilihat dalam Tabel 11.

**Tabel 11.** Hasil karakterisasi produk kitosan

	Jenis uji	SNI 7949:2013 dan kitosan komersil	Hasil uji
1.	Warna	Cokelat muda sampai putih	Putih kekuningan
2.	Kadar air (% bk)	Maks 12	10,40
3.	Kadar abu (% bk)	≤ 2%	1,13
4.	Total nitrogen (% bk)	≤ 5%	7,10
5.	Derajat deasetilasi	≥ 70%	97 %
6.	Viskositas (cPs)		
	- Rendah	< 200	6-10 cPs
	- Medium	200-799	
	- Tinggi	800-2000	
	- Ekstrak tinggi	> 2000	
7.	Ukuran partikel	Serpihan sampai bubuk	Bubuk
8.	Kandungan logam		
	- Timbal (Pb)	≤ 1,0	0,010
	- Arsen (As)	≤ 0,2	0,001

Berdasarkan Tabel 11 menunjukkan bahwa produk kitosan yang digunakan dalam penelitian memenuhi spesifikasi berdasarkan Badan Standarisasi Nasional Tahun 2013 Nomor 7949 tentang standar mutu kitosan syarat mutu dan pengolahan. Kemurnian kitosan dapat dilihat dari kadar air dan kadar abu yang rendah, namun memiliki derajat deasetilasi yang tinggi. Semakin tinggi derajat deasetilasi, semakin banyak gugus amina ( $\text{NH}_2$ ) pada rantai molekul kitosan sehingga kitosan semakin reaktif (Suptijah, 2006). Derajat deasetilasi pada penelitian ini sebesar 97%. Derajat deasetilasi kitosan uji memenuhi standar mutu kitosan yaitu  $\geq 70\%$ .

Nilai kadar air kitosan diketahui 10,40%. Nilai ini lebih rendah dari nilai karakteristik kitosan SNI dengan nilai kadar maks 12%. Besarnya nilai kadar air dipengaruhi oleh proses pengeringan, jumlah kitosan yang dikeringkan, luas tempat pengeringan dan sarana pengeringan (Saleh dalam Nadia, 2014).

Kadar abu merupakan parameter untuk mengetahui mineral yang terkandung dalam kitosan dan dapat mempengaruhi kelarutan, mengakibatkan viskositas rendah atau dapat mempengaruhi karakteristik produk akhir. Kadar abu yang diperoleh 1,13% dan telah memenuhi persyaratan mutu yang telah ditetapkan. Kadar abu yang rendah menunjukkan kadar mineral yang rendah. Faktor yang mempengaruhi nilai kadar abu kitosan adalah proses demineralisasi dan air yang digunakan ketika penetralan pH. Proses pencucian yang baik, berpengaruh terhadap kadar abu dan mineral yang telah terlepas dari bahan dan akan berikatan dengan pelarut sehingga terbuang dengan air (Nadia, dkk., 2014).

Kadar nitrogen menentukan sifat kitosan yang berinteraksi dengan gugus amina ( $\text{NH}_2$ ). Keberadaan  $\text{NH}_2$  menyebabkan kitosan memiliki reaktivitas yang tinggi, sehingga kitosan mampu mengikat air dan larut dalam asam asetat. Semakin tinggi kandungan nitrogen dalam kitosan maka akan menyebabkan semakin berkurang fungsinya. Kadar nitrogen kitosan yang dihasilkan melebihi standar mutu yang ditetapkan, yaitu 7,10%. Hal ini dikarenakan konsentrasi NaOH yang tinggi dan waktu proses deproteinase akan menyebabkan terjadinya reaksi antara protein

dengan larutan pembentuk ester (Na-proteinat) belum sempurna, sehingga protein yang dihilangkan tidak terlalu banyak (Nadia, 2014; Suptijah, 2011).

Kitosan yang digunakan memiliki viskositas sebesar 6-10 cPs dan telah memenuhi standar mutu kitosan kategori rendah. Tinggi rendahnya viskositas dipengaruhi oleh tahap deasetilasi pada proses pembuatan kitosan. Lamanya proses deasetilasi dan tingginya konsentrasi NaOH akan menurunkan berat molekul dan viskositas. Kitosan memiliki rantai yang lebih pendek bila dibandingkan kitin. Peningkatan konsentrasi NaOH akan menurunkan berat molekul, hal ini disebabkan adanya pemecahan ikatan polimer (depolymerisasi) rantai molekul kitosan (Nadia, 2014; Suptijah, 2011).

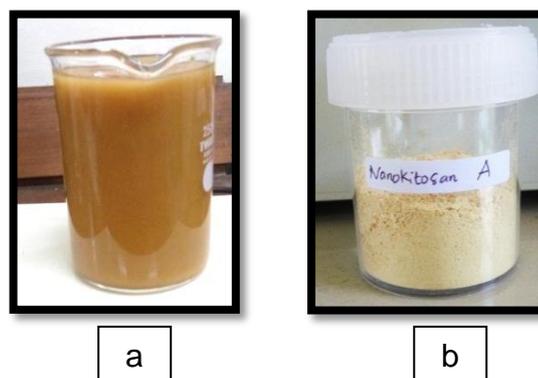
#### **D. Sintesis dan Karakteristik Nanokitosan**

Sintesis nanokitosan dilakukan dengan metode gelasi ionik, karena prosesnya relatif sederhana dan mudah, serta menghindari penggunaan pelarut organik dengan temperatur tinggi (Rampino, dkk., 2013). Pada penelitian ini, pembuatan nanokitosan mengacu pada metode Suptijah, dkk (2011). Metode ini dimulai dengan melarutkan kitosan ke dalam asam asetat 2%. Penggunaan asam asetat 2% sebagai pelarut kitosan, karena sifat kitosan yang tidak dapat larut dalam air dan hanya dapat larut dalam pelarut dan pH yang asam. Konsentrasi asam asetat 2% merupakan konsentrasi yang tepat agar kitosan dapat dilarutkan dengan sempurna dalam membentuk nanopartikel serta

menghasilkan serbuk yang lebih banyak dibandingkan konsentrasi yang rendah (Aranaz, *et al.*, 2009).

Kitosan selanjutnya ditambahkan dengan natrium tripoliposfat (NaTPP) 0,1% sebagai bahan pengikat silang (*cross linker*) dengan kitosan. Penambahan (NaTPP) dengan konsentrasi 0,1% merupakan konsentrasi yang optimum untuk membentuk partikel berukuran nano (Yudhasasmita dan Nugroho, 2017).

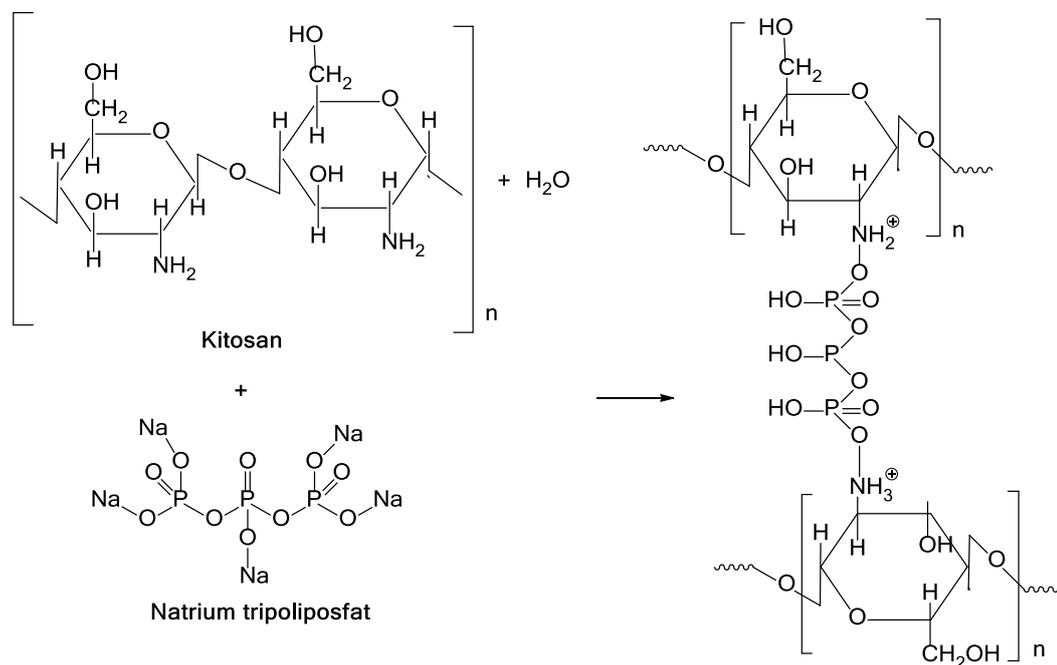
Penambahan natrium tripoliposfat sebagai bahan pengikat silang dengan kitosan, dicirikan dengan terbentuknya koloid atau larutan putih keruh. Hal ini menunjukkan telah terjadi proses ikat silang antara gugus amino dari kitosan dengan gugus tripoliposfat yang membentuk matriks nanopartikel. Larutan dan serbuk nanokitosan hasil pengeringan dengan *spray dryer* ditunjukkan pada Gambar 13.



**Gambar 13.** (a) Larutan nanokitosan (b) Serbuk nanokitosan

Reaksi polimer kitosan dan natrium tripoliposfat (NaTPP) melibatkan interaksi antara muatan positif ( $\text{NH}_3^+$ ) dari kitosan dengan muatan negatif ( $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ ) dari natrium tripoliposfat. Hasil penelitian yang

dilaporkan Saravanabhavan, *et al.*, (2013) menyebutkan bahwa dengan digunakannya tripoliposfat sebagai salah satu pasangan ion kitosan, hasil nanopartikel yang didapatkan lebih stabil dan memiliki karakteristik penembusan membran yang lebih baik. Pemilihan ion tripoliposfat (TPP) sebagai pengikat silang karena TPP memiliki lebih banyak muatan negatif sehingga dapat berinteraksi lebih kuat dibandingkan polianion lain seperti sulfat dan sitrat (Zeng, *et al.*, 2010). TPP juga bersifat non-toksik yang tidak akan mengubah biokompatibilitas kitosan sehingga sesuai untuk aplikasi biomedis (Alauhdin, 2014). Reaksi ikat silang ionik kitosan dengan TPP ditunjukkan pada Gambar 13.

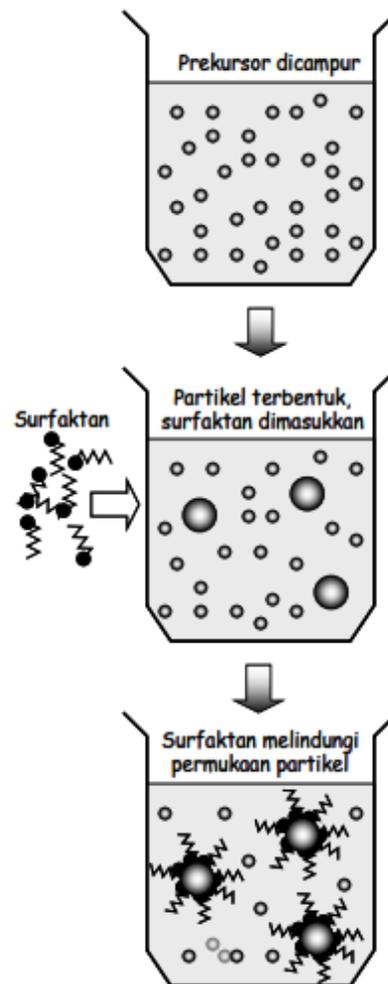


**Gambar 14.** Proses ikat silang ionik kitosan dengan TPP

Larutan kitosan yang telah tercampur dengan natrium tripoliposfat ditambahkan *tween* 80. Penambahan *tween* 80 sebagai surfaktan

berfungsi untuk menstabilkan emulsi partikel dalam larutan dengan cara mencegah timbulnya penggumpalan (aglomerasi) antar partikel. Partikel kitosan di dalam larutan terselimuti dan terstabilkan satu dengan yang lain karena adanya surfaktan, sehingga proses pemecahan partikel akan semakin efektif dan tidak terjadi aglomerasi (Nadia, dkk., 2014; Marrisa, 2017).

Selain itu, penggunaan surfaktan untuk mengontrol ukuran partikel nanokitosan yang dihasilkan. Hal ini karena partikel koloid yang telah dibuat begitu ukuran sudah mencapai nilai yang diinginkan, jika tidak dideaktivasi maka permukaan ukuran partikel koloid biasanya akan terus bertambah selama masih ada sisa atom-atom prekursor di dalam larutan tersebut. Molekul surfaktan akan menempel pada permukaan koloid yang dibuat dan melindungi permukaan tersebut dari penambahan atom prekursor lebih lanjut meskipun didalam koloid masih ada atom prekursor yang belum bereaksi. Berikut ilustrasi penambahan surfaktan *tween* 80 dalam pembentukan nanokitosan yang ditunjukkan pada Gambar 15.

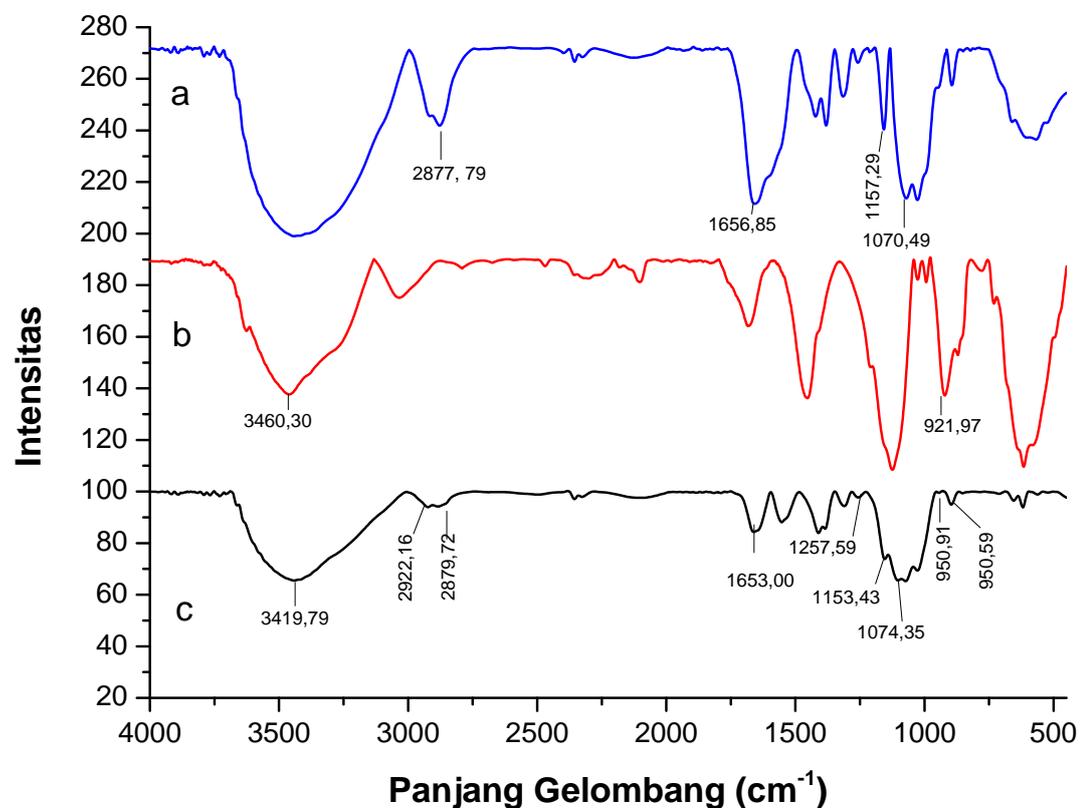


**Gambar 15.** Penambahan surfaktan *tween* 80 dalam pembentukan nanokitosan (Abdullah, dkk., 2008)

Nanokitosan yang dihasilkan berupa serbuk putih kekuningan dengan rendemen yang tinggi yaitu 14, 27 g. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilaporkan Suptijah, dkk., (2011), dimana metode yang lebih efektif menghasilkan nano partikel adalah metode *sizing* dengan *magnetic stirrer*. Metode gelas ionik dengan *magnetic stirrer* memiliki kelebihan yaitu proses homogenisasi antara larutan kitosan dengan bahan gelas ionik dapat dikendalikan secara merata dengan kecepatan

tinggi menghasilkan partikel-partikel yang homogen dan stabil dengan ukuran lebih merata, dibawah 1000 nm serta tidak terjadi aglomerasi. Berbeda dengan alat lain pembentukan nano partikel bisa lebih kecil tetapi masih terjadi aglomerasi partikel bahkan mungkin polimerisasi, sehingga dalam proses pengeringan yang terbentuk partikel nano hanya partikel yang tadinya sudah stabil (Suptijah, dkk, 2011; Mayyas dan Al-Remawi, 2012).

Analisis gugus fungsi senyawa nanokitosan yang diperoleh dilakukan dengan menggunakan spektroskopi FTIR. Spektra kitosan, Na-TPP dan nanokitosan dapat dilihat pada Gambar 16.



**Gambar 16.** Spektra IR (a.) Kitosan, (b.) Na-TPP, (c.) Nanokitosan

Daerah serapan dari spektrum FTIR yang tampak menunjukkan ikatan nanokitosan berbeda dengan kitosan komersil. Pada nanokitosan absorbansi ikatan amida I dan amida II ditemukan pada  $1653\text{ cm}^{-1}$  dan  $1564,27\text{ cm}^{-1}$  dibandingkan kitosan pada  $1656\text{ cm}^{-1}$  dan  $1421,45\text{ cm}^{-1}$ . Gugus  $\text{-NH}$  nanokitosan ditunjukkan dengan adanya pita yang tajam pada daerah serapan  $2922,16\text{ cm}^{-1}$  disebabkan oleh peregangan alifatik  $\text{-CH}$  asimetris. Puncak yang kuat diperoleh pada daerah  $1653\text{ cm}^{-1}$  dan  $896,9\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya  $\text{-NH}$  bending, peregangan hubungan glikosidik C-O-C dan peregangan C-C. Bilangan gelombang  $1257,91\text{ cm}^{-1}$ ,  $1153,43\text{ cm}^{-1}$  dan  $1074,35\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya vibrasi P=O *stretching* karena interaksi Na-TPP dengan kitosan dan menegaskan perubahan kitosan menjadi nanokitosan (Gokila, *et al.*, 2018; Rajehwari *et al.*, 2016), puncak dengan bilangan gelombang  $1074,35$ ;  $1031,92$  dan  $950,91\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi P-OH *stretching* dan puncak dengan bilangan gelombang  $896,90\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi P-O *stretching*. Perubahan puncak tersebut disebabkan oleh ikatan antara muatan dari pengikat silang TPP dengan gugus positif amino ( $\text{R-NH}_3^+$ ) dari kitosan (Ko, *et al.*, 2010).

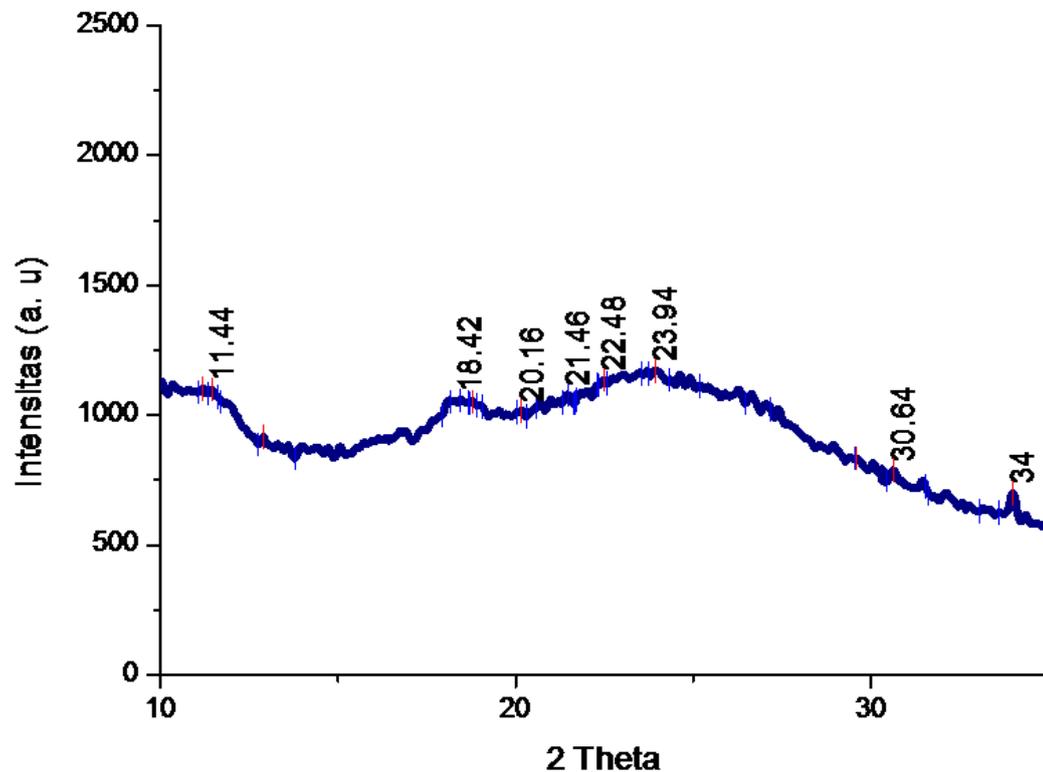
Analisis dengan XRD bertujuan untuk melihat bentuk kristal serta menentukan ukurannya. Dari spektrum terlihat tidak ada puncak dengan intensitas yang tinggi dan tajam serta tidak ada pola puncak difraksi, sehingga nanokitosan dikatakan memiliki struktur berupa amorf (Fridawati, 2008).

Ukuran partikel yang diperoleh berkisar antara 14,10 hingga 78,59 nm yang dapat dilihat pada Lampiran 7. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang diperoleh Rajeshwari, *et al.*, (2016) dan Ghadi, *et al.*, (2014) yang memperoleh hasil diameter partikel nanokitosan berkisar antara 10 hingga 80 nm yang dilapisi dengan baik oleh partikel Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Pengukuran partikel nanokitosan menggunakan formula Scherrer pada persamaan 2.

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad (2)$$

dimana  $\lambda$  = panjang gelombang sinar-X yang digunakan,  $\theta$  = sudut difraksi, K = adalah konstanta yang besarnya tergantung pada faktor bentuk kristal, bidang (hkl) difraksi dan definisi besaran  $\beta$  yang digunakan, apakah sebagai *Full Width at Half Maximum (FWHM)* atau *Integral Breadth* dari puncak. Nilai yang umumnya digunakan untuk K adalah 0,94 jika  $\beta$  adalah FWHM (Sumadiyasa dan Manuaba, 2018). Berdasarkan data perhitungan pada lampiran 7, partikel yang diperoleh berada pada orde nano karena memiliki ukuran yang tidak lebih besar dari 100 nm.

Pola difraksi sinar-X dari partikel nanochitosan yang diperoleh dengan menggunakan teknik gelas ion ditunjukkan pada Gambar 17.

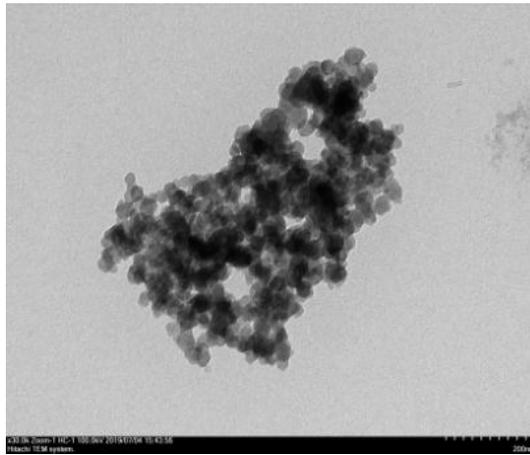


**Gambar 17.** Pola difraksi sinar-X nanokitosan

Pola difraksi sinar-X nanokitosan memperlihatkan puncak karakteristik yang khas pada nilai  $2\theta = 18,42^{\circ}$  yang menunjukkan bahwa struktur kristalnya berbentuk amorf. Bentuk amorf disebabkan kitosan yang berikatan dengan ion tripoliposfat semakin banyak. Selain itu, spektrum difraksi sinar-X menunjukkan perluasan dari puncak yang khas pada nilai  $2\theta$  yaitu  $20,16^{\circ}$ ,  $21,46^{\circ}$ ,  $22,48^{\circ}$  dan  $23,94^{\circ}$  karena adanya pengikatan silang antara ionik TPP dengan kitosan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian (Gokila, *et al.*, 2018; Rajehwari, *et al.*, 2016; Sivakami, *et al.*, 2013) yang menunjukkan bentuk nanokitosan adalah amorf. Menurut Hargono (2008) dan Sugita dkk (2009), nanokitosan berupa

padatan amorf yang berwarna putih kekuningan pada konsentrasi asam asetat 2%.

Karakteristik bentuk nanokitosan digunakan Transmission Electron Microscopy (TEM). Bentuk TEM nanopartikel dapat dilihat pada Gambar 18.



**Gambar 18.** Morfologi nanopartikel pada TEM pada perbesaran 20.000x

Pengamatan TEM pada Gambar 18 menunjukkan bentuk nanokitosan heksagonal yang tidak seragam. Hal ini karena adanya agregasi fisik akibat bentuk partikel yang kurang sferis/bulat sehingga mempermudah kontak antar partikel pada nanokitosan.

### E. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian antibakteri ekstrak daun *A.muricata* L. dilakukan dengan mengukur diameter daya hambat (DDH) terhadap pertumbuhan bakteri gram positif berupa *Staphylococcus aureus* dan gram negatif *Escherichia coli* dengan metode difusi agar. Metode ini merupakan

metode yang relatif mudah, biaya murah dan sangat cocok untuk bakteri dengan pertumbuhan cepat yang dilakukan dengan cara mengukur diameter daerah bening di sekitar paper disk yang menunjukkan aktivitas antibakteri. Daerah bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri lainnya yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat (Kuate, dkk., 2011). Diameter zona hambat diukur dalam satuan millimeter (mm) menggunakan jangka sorong dengan cara diameter keseluruhan dikurangi diameter kertas cakram sebesar 6 mm. Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya anti bakterinya berdasarkan penggolongan Davis and Stout (1971).

Pada pengujian daya hambat digunakan kontrol positif berupa kloramfenikol, sebagai pembanding aktivitas antibakteri dari sampel. Sedangkan kontrol negatif digunakan akuades untuk mengetahui apakah respon penghambatan benar-benar berasal dari sampel bukan disebabkan oleh faktor teknis perlakuan. Penggunaan kloramfenikol sebagai kontrol positif karena merupakan senyawa antimikroba berspektrum luas yang dapat digunakan untuk bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif. Kloramfenikol bekerja dengan menghambat sintesis protein bakteri, yang dihambat adalah enzim peptidil transferase yang berperan sebagai katalisator untuk membentuk ikatan-ikatan peptida pada proses sintesis protein pada bakteri (Brooks, *et al.*, 2016).

### 1. Uji aktivitas antibakteri pada daun *A. muricata* L.

Hasil pengukuran diameter zona hambat sampel terhadap kedua bakteri uji setelah diinkubasi 24 dan 48 jam dapat dilihat pada Tabel 12.

**Tabel 12.** Diameter zona hambatan dari ekstrak daun *A. muricata* L.

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diameter zona hambat			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
250	10,60	12,60	9,80	11,90
125	9,20	11,70	9,10	10,40
62,5	8,70	10,80	7,80	9,60
31,25	8,50	10,20	7,40	8,80
15,625	7,80	9,60	7,00	8,20
Kontrol (+)	31,90	29,00	31,80	30,40
Kontrol (-)	6,00	6,00	6,00	6,00

Pada penelitian ini aktivitas antibakteri dari sampel ekstrak *A. muricata* L. ditandai dengan adanya zona bening disekitar *paper disc*. Berdasarkan Tabel 12, daun *A. muricata* L. umumnya dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *S.aureus*.

Terjadinya penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri disebabkan karena terdapat zat atau senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau menyebabkan kematian bakteri dengan beberapa mekanisme yaitu penghambatan terhadap sintesis dinding sel, penghambatan terhadap fungsi membran sel, penghambatan terhadap sintesis protein atau penghambatan terhadap sintesis asam nukleat (Brooks, *et al.*, 2016).

Aktivitas antibakteri ini dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: konsentrasi ekstrak, kandungan senyawa antibakteri, daya difusi ekstrak dan jenis bakteri yang dihambat. Aktivitas antibakteri terhadap *E.coli* dan *S. aureus* oleh ekstrak etanol daun sirsak disebabkan oleh senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak tersebut yaitu alkaloid, fenol, flavonoid, steroid dan saponin. Semakin lebar zona hambat yang terbentuk menandakan semakin kuat senyawa bioaktif yang terkandung dalam daun *A. muricata* L. untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Mekanisme alkaloid pada daun *A. muricata* L. sebagai antibakteri yakni dengan cara merusak komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel tersebut. Mekanisme senyawa saponin menghambat pertumbuhan bakteri dengan menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Mekanisme steroid merusak membran plasma sel mikroba yang menyebabkan bocornya sitoplasma keluar sel sehingga menyebabkan kematian sel bakteri tersebut. Mekanisme flavonoid dengan mengganggu permeabilitas dari membran sel dan mendenaturasi protein sel (Brooks, *et al.*, 2016; Sari, dkk., 2016; Sabir, 2005).

Mekanisme membran sel bakteri berfungsi sebagai selektor yang mengatur keluar masuknya senyawa ke dalam sel bakteri. Sehingga melalui membran sel ini, beberapa senyawa ditranspor secara aktif. Terganggunya permeabilitas dari membran sel yang disebabkan oleh

metabolit sekunder yang terdapat dalam daun sirsak yaitu saponin, dan flavonoid menyebabkan terganggunya fungsi dari membran sel sebagai selektor terhadap beberapa senyawa, yang menyebabkan terjadinya kebocoran sel. Kebocoran sel bakteri menyebabkan keluarnya komponen sel/organel yang berfungsi untuk menjalankan kehidupan sel bakteri dan mempertahankan fungsi normal kehidupan sel bakteri. Apabila semua fungsi tersebut terganggu akan mengakibatkan kerusakan dari sel bakteri yang menyebabkan bakteri menjadi lisis dan terjadi kematian sel bakteri. Mekanisme antibakteri daun sirsak selain menyebabkan terjadinya gangguan pada permeabilitas dari membran sel juga dengan menyebabkan terjadinya denaturasi protein membran sel oleh senyawa flavonoid dan fenolik. Denaturasi protein adalah kerusakan struktur tersier dari protein yang menyebabkan terjadinya kerusakan pada protein dan menyebabkan protein tidak dapat berfungsi. Protein berfungsi dalam metabolisme sel bakteri, kerusakan protein dapat menyebabkan terganggunya proses metabolisme bakteri sehingga terganggunya kehidupan sel bakteri dan kematian bakteri (Sabir, 2005).

Davis dan Stout (1971) mengemukakan bahwa membran sel yang tersusun atas protein dan lipid sangat rentan terhadap zat kimia yang dapat menurunkan tegangan permukaan. Kerusakan membran sel menyebabkan terganggunya transport nutrisi (senyawa dan ion) melalui membran sel sehingga sel bakteri mengalami kekurangan nutrisi yang diperlukan bagi pertumbuhannya.

Zona hambat dalam penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak ukdaun *A. muricata* L. memiliki efek antibakteri pada bakteri *E.coli* dan *S. aureus* namun zona hambat ekstrak daun *A. muricata* L. lebih kecil dibandingkan kloramfenikol sebagai kontrol positif yang menunjukkan diameter zona hambat yang lebih besar karena memiliki spektrum yang lebih luas dalam menghambat bakteri. Ekstrak daun *A. muricata* L. lebih kecil bukan berarti kurang aktif kemungkinan dipengaruhi karena kondisi lingkungan, media bakteri uji, suhu, waktu inkubasi, dan umur bakteri juga memengaruhi lebar zona hambat yang terbentuk pada tiap perlakuan konsentrasi ekstrak. Menurut Hermawan (2007), interpretasi daerah hambatan pertumbuhan antimikroba mengacu pada standar umum yang di keluarkan Departemen Kesehatan tahun 1988, disebutkan bahwa mikroba dikatakan peka terhadap antimikroba asal tanaman bila mempunyai ukuran diameter daya hambatan sebesar 12-24 mm.

## **2. Uji aktivitas antibakteri pada nanokitosan**

Aktivitas zona hambat pada nanokitosan terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* dapat dilihat pada Tabel 13.

**Tabel 13.** Diameter zona hambatan dari nanokitosan

Konsentrasi (mg/mL)	Diameter zona hambat			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
10	7,80	8,10	8,00	9,00
5	7,60	7,90	7,10	8,60
2,5	6,80	7,80	6,80	8,00
1,25	6,60	7,60	6,60	7,80
Kontrol (+)	24,3	22,80	21,30	19,1
Kontrol (-)	6,00	6,00	6,00	6,00

Berdasarkan data Tabel 13, menunjukkan aktivitas zona hambat yang kecil, diduga disebabkan oleh kemampuan zat aktif nanokitosan yang lemah dalam menghambat pertumbuhan bakteri secara *in vitro*. Penyebab lain kecilnya zona bening yang dihasilkan oleh nanokitosan diduga disebabkan oleh laju difusi zat aktif pada media uji yang tidak maksimal, sehingga sebagian zat aktif tidak dapat berdifusi dengan baik pada media uji.

Aktivitas antibakteri nanokitosan ditunjukkan pada konsentrasi 10 mg/mL pada bakteri *S. aureus* dan *E. coli* sebagai konsentrasi uji tertinggi. Berdasarkan lama waktu inkubasinya, aktivitas antibakteri nanokitosan mengalami peningkatan zona hambat pada saat 48 jam. Mekanisme kemampuan nanokitosan sebagai antibakteri karena nanokitosan mempunyai gugus fungsional amina (-NH<sub>2</sub>) yang bermuatan positif sangat kuat yang dapat menarik molekul asam amino bermuatan

negatif pembentuk protein dalam bakteri. Gugus fungsional amina juga memiliki pasangan elektron bebas sehingga dapat menarik mineral  $Mg^{2+}$  yang terdapat pada ribosom dan mineral  $Mg^{2+}$  yang terdapat pada dinding sel bakteri membentuk ikatan kovalen koordinasi. Hal tersebut menjadikan kitosan dapat menimbulkan kebocoran konstituen intraseluler sehingga bakteri tersebut akan mati (Sarwono, 2010).

Sifat kitosan sebagai antibakteri membuat kitosan banyak digunakan dalam bidang industri makanan, pengolahan air, pertanian, pengolahan limbah, bioteknologi, kosmetik, koagulan dan kesehatan (Sari, dkk., 2013).

### **3. Uji aktivitas antibakteri pada fortifikasi daun *A. muricata* L. dan nanokitosan**

Aktivitas zona hambat pada fortifikasi daun *A. muricata* L. dan nanokitosan terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* terdapat pada Tabel 15 yang menunjukkan aktivitas zona hambat dari fortifikasi daun *A. muricata* L. dan nanokitosan mengalami peningkatan tergantung perbandingannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. Data hasil penelitian menunjukkan fortifikasi daun *A. muricata* L. dan nanokitosan perbandingan 3:1 yang tertinggi dalam menghambat bakteri pada *E.coli*, sedangkan yang tertinggi dalam menghambat *S.aureus* adalah fortifikasi daun *A. muricata* L. dan nanokitosan perbandingan 1:3.

**Tabel 14.** Diameter zona hambatan dari fortifikasi daun *A. muricata* L. dan nanokitosan

Konsentrasi	Diameter zona hambat			
	<i>E.coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
1 : 1	7,60	9,70	8,00	9,10
2 : 1	8,70	10,20	9,20	10,70
3 : 1	9,20	11,20	10,10	11,20
1 : 2	9,00	10,50	10,80	11,70
1 : 3	8,30	9,60	11,40	12,20
Kontrol (+)	36,00	34,60	32,50	31,20
Kontrol (-)	6,00	6,00	6,00	6,00

Berdasarkan data Tabel 14 menunjukkan dengan adanya zona bening disekitar *paper disc* yang membuktikan bahwa fortifikasi antara nanokitosan dan daun *A. muricata* L. semakin meningkatkan kemampuan antibakteri baik dari daun *A. muricata* L. maupun nanokitosan. Kemampuan antibakteri lebih meningkat karena adanya senyawa bioaktif dari daun *A. muricata* L. dan gugus fungsional amina (-NH<sub>2</sub>) yang bermuatan positif sangat kuat yang dapat menarik molekul asam amino bermuatan negatif pembentuk protein dalam mikroba dari nanokitosan yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Berdasarkan aktivitas daya hambat daun *A. muricata* L. dan nanokitosan sebagai antibakteri digolongkan sebagai zat bakteriostatik,

yaitu suatu senyawa yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan atau perbanyak bakteri pada dosis biasa (Madigan, 2008).

### F. Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak digunakan reagen 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Penggunaan reagen ini karena selain reagen yang paling umum dan banyak digunakan oleh peneliti terdahulu juga pengerjaannya yang sederhana, mudah dan cepat serta hanya membutuhkan sedikit sampel (Prior, dkk., 2005), kemudian pengujian dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Pengukuran serapan dilakukan setelah inkubasi selama 30 menit agar terjadi reaksi antara DPPH sebagai radikal bebas dengan sampel yang akan diuji. Pengukuran absorbansi dilakukan pada ekstrak daun *A. muricata* L., nanokitosan, fortifikasi daun *A. muricata* L. dan nanokitosan serta kontrol positif berupa asam askorbat.

**Tabel 15.** Aktivitas antioksidan pada *A. muricata* L.

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi rata-rata	Aktivitas antioksidan (%)	IC <sub>50</sub>	Indeks Aktivitas Antioksidan (IAA)
10	0.63	9.62		
20	0.62	11.62		
40	0.55	21.14	141,127	Sedang
80	0.41	41.62		
160	0.34	51.24		
Kontrol	0.70	0.48		

**Tabel 16.** Aktivitas antioksidan pada nanokitosan

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi rata-rata	Aktivitas antioksidan (%)	IC <sub>50</sub>	Indeks Aktivitas Antioksidan (IAA)
500	0.62	10.14		
1000	0.59	13.82		
2000	0.52	25.22	8633,023	Sangat lemah
4000	0.42	39.13		
8000	0.40	42.13		
Control	0.69	0,00		

**Tabel 17.** Aktivitas antioksidan fortifikasi daun *A. muricata* L. dan nanokitosan (1:1)

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi rata-rata	Aktivitas antioksidan (%)	IC <sub>50</sub>	Indeks Aktivitas Antioksidan (IAA)
10	0.60	5.66		
20	0.60	6.39		
40	0.57	10.48	246,436	Sedang
80	0.51	19.60		
160	0.42	33.23		
Control	0.64	0,00		

**Tabel 18.** Aktivitas antioksidan fortifikasi daun *A. muricata* L. dan nanokitosan (2:1)

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi rata-rata	Aktivitas antioksidan (%)	IC <sub>50</sub>	Indeks Aktivitas Antioksidan (IAA)
10	0.60	5.93		
20	0.59	8.74		
40	0.58	9.26	240,009	Sedang
80	0.52	19.24		
160	0.42	34.79		
Kontrol	0.64	0,00		

**Tabel 19.** Aktivitas antioksidan fortifikasi daun *A. muricata* L. dan nanokitosan (3:1)

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi rata-rata	Aktivitas antioksidan (%)	IC <sub>50</sub>	Indeks Aktivitas Antioksidan (IAA)
10	0.59	7.29		
20	0.56	11.30		
40	0.51	19.12	131,749	Sedang
80	0.40	36.56		
160	0.27	57.69		
Kontrol	0.63	0,00		

**Tabel 20.** Aktivitas antioksidan fortifikasi daun *A. muricata* L. dan nanokitosan (1:2)

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi rata-rata	Aktivitas antioksidan (%)	IC <sub>50</sub>	Indeks Aktivitas Antioksidan (IAA)
10	0.62	2.77		
20	0.61	5.12		
40	0.59	7.31	330,908	Lemah
80	0.56	12.23		
160	0.48	25.34		
Control	0.64	0,00		

**Tabel 21.** Aktivitas antioksidan fortifikasi daun *A. muricata* L. dan nanokitosan (1:3)

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi rata-rata	Aktivitas Antioksidan (%)	IC <sub>50</sub>	Indeks Aktivitas Antioksidan (IAA)
10	0.61	5.41		
20	0.61	5.67		
40	0.61	6.03	519,571	Sangat lemah
80	0.57	11.75		
160	0.53	17.98		
Kontrol	0.65	0,00		

**Tabel 22.** Aktivitas antioksidan asam askorbat (kontrol positif)

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi rata-rata	Aktivitas antioksidan (%)	IC <sub>50</sub>	Indeks Aktivitas Antioksidan (IAA)
0.25	0.304	27.10		
0.5	0.289	30.70		
1	0.27	35.25		
2	0.239	42.69	2,597	Sangat aktif
4	0.15	64.03		
Kontrol	0.417	0,00		

Parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan dari *A. muricata* L., nanokitosan dan fortifikasi keduanya ialah *inhibitor concentration* (IC<sub>50</sub>) yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50 % dari radikal bebas DPPH (Andayani dkk, 2008). Jika aktivitas antioksidannya semakin tinggi maka nilai IC<sub>50</sub> akan semakin kecil (Molyneux, 2004).

Nilai IC<sub>50</sub> dari ekstrak daun *A. muricata* L., nanokitosan dan larutan pembanding berupa vitamin C masing-masing sebesar 141,127 µg/mL, 8633, 023 µg/mL dan 2, 597 µg/mL. Nilai IC<sub>50</sub> dari fortifikasi daun *A. muricata* L. dan nanokitosan 1:1, 2:1, 3:1, 1:2 dan 1:3 berturut-turut sebesar 24,496 µg/mL, 240,009 µg/mL, 131,749 µg/mL, 330,908 µg/mL dan 519,571 µg/mL. Vitamin C sebagai kontrol positif memiliki nilai IC<sub>50</sub> 2,597.

Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan larutan pembanding vitamin C, karena vitamin ini sangat baik dalam

menghambat radikal bebas dan banyak digunakan oleh peneliti-peneliti sebagai kontrol positif pada pengujian antioksidan.

Data nilai  $IC_{50}$  memperlihatkan bahwa intensitas kemampuan aktivitas antioksidan daun *A. muricata* L. termasuk antioksidan sedang dan pada nanokitosan termasuk antioksidan sangat lemah. Pada kontrol positif (pembanding) yaitu vitamin C memiliki intensitas kemampuan aktivitas antioksidan kuat. suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai  $IC_{50}$  kurang dari 50  $\mu\text{g/mL}$ , antioksidan kuat jika nilai  $IC_{50}$  50-100  $\mu\text{g/mL}$ , antioksidan sedang jika nilai  $IC_{50}$  100-150  $\mu\text{g/mL}$ , dan antioksidan lemah jika  $IC_{50}$  bernilai lebih dari 150  $\mu\text{g/mL}$  (Molyneux, 2004).

Ekstrak daun *A. muricata* L memiliki aktivitas antioksidan karena ekstrak daun *A. muricata* L mengandung senyawa yang efektif sebagai antioksidan, salah satunya flavonoid. Menurut Perwiratami, *et al.*, (2014) menyatakan bahwa ada korelasi yang baik antara senyawa flavonoid dan aktivitas antioksidan, dimana semakin tinggi kandungan flavonoid suatu sampel maka aktivitas antioksidan semakin kuat. Mekanisme kerja dari flavonoid sebagai antioksidan baik secara langsung maupun tidak langsung. Secara langsung, flavonoid mendonorkan ion hidrogen sehingga dapat menstabilkan radikal bebas yang reaktif (Saija, 1995) dan secara tidak langsung, bekerja didalam tubuh dengan meningkatkan ekspresi gen antioksidan melalui aktivitas *nuclear factor erythrid 2 related factor 2* (Nrf2) sehingga terjadi peningkatan gen yang berperan dalam

sintesis enzim antioksidan endogen seperti *superoxide dismutase* (SOD) (Sumardika dan Jawi, 2012).

Menurut Sari, dkk (2013), kitosan dapat bersifat sebagai antioksidan dengan adanya penambahan bahan ataupun modifikasi kitosan dalam bentuk fisik menjadi nanokitosan karena kitosan cenderung mudah rapuh dan pecah dalam aplikasinya. Hal ini ditunjukkan dalam penelitiannya bahwa dengan penambahan glukosa 1% di dalam kitosan terbukti dapat melawan bakteri perusak makanan dan bakteri patogen serta memiliki antioksidan. Sedangkan penambahan berbagai macam gula (glukosa, fruktosa, laktosa, arabinosa dan galaktosa) dapat menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus*. Reaksi Maillard terbentuk pada proses sterilisasi antara gula dan gugus amin. Reaksi Maillard menghasilkan senyawa reduktion terhadap radikal bebas sehingga dapat membentuk antioksidan yang lebih baik.

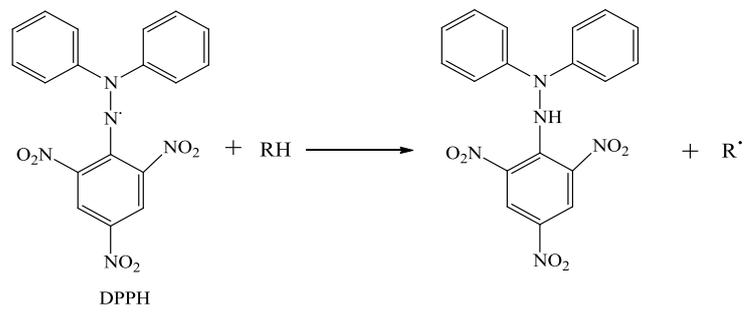
Hal ini didukung oleh penelitian Vinsova dan Vavrikova (2011), dimana kitosan mampu menyumbangkan ion hidrogen yang kuat dalam menghambat peroksidasi lipid fosfatidikolin dan liposom linoleat, namun perlu dikombinasikan dengan senyawa lain seperti flavonoid, fenol, polifenol dan glukosa agar efektif sebagai antioksidan.

Adanya fortifikasi antara daun *A. muricata* L. dan nanokitosan mampu meningkatkan nilai IC<sub>50</sub>. Dimana, antioksidan pada fortifikasi tertinggi adalah pada perbandingan daun *A. muricata* L. dan nanokitosan

(3:1) dan yang terlemah pada perbandingan daun *A. muricata* L. dan nanokitosan (1:3). Hal ini menunjukkan bahwa dengan semakin banyak ekstrak daun *A. muricata* L., maka aktivitas antioksidan semakin meningkat dengan bertambahnya nilai  $IC_{50}$ , begitupun sebaliknya.

Mekanisme penangkapan radikal DPPH oleh antioksidan yaitu berupa donasi proton kepada radikal (Sayuti dan Yenrina, 2015) dan uji antioksidan ini didasarkan pada pengukuran perubahan warna dari DPPH setelah bereaksi dengan sampel (Prior, dkk., 2005). Hal ini bisa diamati pada perubahan warna yang terjadi yang semula berwarna violet pekat menjadi kuning pucat. Perubahan ini menunjukkan adanya aktivitas antioksidan dari sampel.

Semakin tinggi konsentrasi sampel yang mengandung senyawa antioksidan maka warna kuning yang terbentuk akan semakin terang. Perubahan warna DPPH ini terkait dengan energi yang dimiliki radikal bebas. Saat berada dalam keadaan radikal, DPPH cenderung tidak stabil. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya pemudaran warna ungu dari larutan DPPH, karena DPPH mempunyai satu atom N yang elektronnya tidak berpasangan dan apabila bereaksi dengan senyawa yang dapat meredam radikal bebas maka akan terjadi pengikatan satu elektron dengan atom yang dapat mendonorkan elektronnya (atom H) membentuk *diphenylpicrylhydrazine* yang stabil (DPPH-H) (Molyneux, 2004). Reaksinya dapat dilihat pada Gambar 19.



**Gambar 19.** Reaksi penghambatan radikal bebas DPPH oleh antioksidan

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dari ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) adalah steroid, alkaloid, flavonoid, fenolik dan saponin.
2. Karakteristik nanokitosan yang diperoleh adalah struktur kristalnya amorf, berbentuk heksagonal tidak seragam dan ukuran partikel berkisar antara 14,10 hingga 78,59 nm.
3. Daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dan nanokitosan memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan antioksidan.
4. Fortifikasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dan nanokitosan memiliki pengaruh, dimana perbandingan 3:1 yang tertinggi dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dan perbandingan 1:3 dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* serta berpengaruh meningkatkan kemampuan aktivitas antioksidan tertinggi pada perbandingan 3:1 dengan  $IC_{50}$  131,749.

## **B. Saran**

Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan pengujian fortifikasi nanokitosan dan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) secara *in vivo* dan pada bakteri patogen penyebab penyakit lainnya sebagai pengembangan produk, sehingga semakin meningkatkan manfaatnya dalam bidang kesehatan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M., Virgus Y., Nirmin, Khairulrijal. 2008. Review : Sintesis Nanomaterial. *Journal Nanosains & Teknologi*.1 (2) : 33-59.
- Abubacker, MN., Thiagarajan D., Chandran S. 2014. Isolation and Identification of Biolarvicide from Soursop (*Annona muricata* Linn) Aqueous Leaf Extract to Mosquito (*Aedes aegypti* Linn.) Larvae. *Biolife Journal*. 2 (2) : 579-585.
- Adewole, S.O., Ojewole, JAO. 2009. Protective Effects of *Annona muricata* Linn (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Serum Lipid Profiles and Oxidative Stress in Hepatocytes of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. *Afr Journal Tradit Complement Altern Med*. 6 (1) : 30–41.
- Agu, KC., Paulinus N., Okolie. 2017. Proximate Composition, Phytochemical Analysis, and In Vitro Antioxidant Potentials Of Extracts Of *Annona Muricata* (Soursop). *Food Sci Nutr*. 21 (2) : 1–8.
- Agustina, S., I Made, DS., I Nyoman, S. 2015. Isolasi Kitin, Karakterisasi dan Sintesis Kitosan dari Kulit Udang. *Jurnal Kimia*. 9 (2): 271- 278.
- Agustini, TW., Sedjati, S. 2007. The Effect of Chitosan Concentration and Storage Time on the Quality of Salted Dried Anchovy (*Stolephorus heterolobus*). *Journal of Coastal Development*. 10 (2): 63 – 71.
- Alauhdin M., Widiarti N. 2014. Sintesis dan Modifikasi Lapis Tipis Kitosan-tripoliposfat. *Jurnal MIPA*. 37 (1) : 46-52.
- Alvarenga, ES. 2011. Characterization and Proprties of Chitosan. *In Biotechnology of Biopolymers*. Elnashar, M., Ed, In Tch. *Rijeka Journal, Croatia*. 2 (1): 91-108.
- Andayani, R., Maimunah, Lisawati, Y. 2008. Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat Total dan Likopen pada Buah Tomat (*Solanum lycopersicum* L). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. 13 (1) : 31 - 37.
- Aranaz I, Marian M, Ruth H, Ines P, Beatriz M, Niuris A, Gemma G, and Angeles H. 2009. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Journal Current Chemical Biology*. 3 (1) : 203-230.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's. 2016. Medical Microbiology. 27<sup>th</sup> Edition. New York: The McGraw-Hill Companies Inc.
- Carvalho, M.M.S.G., Stamford T.C.M., Santos E.P., Tenorio P., Sampalo F. 2015. Chitosan as an Oral Antimicrobial Agent. A. Mendez-vilas. 2011 (1) : 542-550.

- Ciptaningsih, E. 2012. Uji Aktivitas Antioksidan dan Karakteristik Fitokimia Pada Kopi Luwak Arabica dan Pengaruhnya Terhadap Tekanan Darah Tikus Normal dan Tikus Hipertensi. Tesis tidak diterbitkan. Depok: Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-Universitas Indonesia.
- Consolacion, Ragasa Y., Soriano G., Torres OB., Don Ming-Jaw., Shen Chien-Chang. 2012. Acetogenins from *Annona muricata*. *Phcog Journal*. 4 (32) : 32-37.
- Davis, W.W. dan T.R. Stout. 1971. Microbial Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay. *Microbiology Journal*. 22 (1) : 659-665.
- Depkes. 2018. Beginilah 4 Manfaat Daun Sirsak untuk Kesehatan. (Online), <http://www.depkes.go.id/development/site/depkes/pdf>, diakses pada tanggal 20 November 2018.
- Domsay T M, Robert. 1985. Evaluation of Infra Red Spectroscopic Techniques for Analyzing Chitosan. *Macromol Chem Journal*. 186 (1) : 16-71.
- Ekaluo U., Ikpeme E., Ibiang Y., Omordi F. 2013. Effect of Soursop (*Annona muricata* L.) Fruit Extract on Sperm Toxicity Induced by Caffeine in Albino Rats. *Journal of Medical Sciences*. 13 (1) : 67-72.
- Endrini S., Suherman S., Widowati W. 2015. *Annona muricata* L. Leaves Have Strongest Cytotoxic Activity Against Breast Cancer Cells. *Universa Medicina* 33 (3) : 179-184.
- Fadhilah, Ismi. 2012. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap Beberapa Mikroba Patogen. Skripsi tidak diterbitkan. Makassar : Fakultas Kesehatan Masyarakat-UIN Alauddin.
- Fatahu. 2015. Sintesis Kitosan–Tripolifosfat Nanopartikel dari Limbah Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) dan Aplikasinya sebagai Bahan Aktif pada Krim Luka Bakar. Thesis tidak diterbitkan. Makassar : Fakultas MIPA – Universitas Hasanuddin.
- Fernandez-Kim S-O. 2004. *Physicochemical and Functional Properties of Crawfish Chitosan as Affected by Different Processing Protocols*. Thesis tidak diterbitkan. Louisiana: Louisiana State University.
- Fibonacci, Anita dan Hulyadi. 2018. Uji Aktivitas Antimikroba Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap *Bacillus subtilis* dan *Eschericia coli*. Volume 2, Nomor 1, Mei 2018. ISSN 2621-5985. *Walisongo Journal Of Chemistry*. 2 (1) : 14-17.
- Fridawati, M. 2008. Analisa Struktur Kristal dari Lapisan Tipis Aluminium (Al) dengan Metode Difraksi Sinar-X. Skripsi tidak diterbitkan.

Yogyakarta : Fakultas Sains dan Teknologi – Universitas Sanata Dharma.

- Gavamukulya, Yahaya, Faten A.E., Fred W., Hany Ael-Shemy. 2014. Phytochemical Screening, Anti-Oxidant Activity and In Vitro Anticancer Potential Of Ethanolic and Water Leaves Extracts Of *Annona Muricata*. *Asian Pacific Journal Trop Biomed.* 4 (1) : 1-8.
- Ghadi, A., Mohjoub, S., Tabandeh, F., Talebnia F. 2014. Synthesis and Optimization of Chitosan Nanoparticles : Potential Applications in Nanomedicine and Biomedical Engineering. *Caspian Journal Intern Med.* 5 (3) : 156-161.
- Gokila, S., Gomathi, Vijayalakshmi K., Alsharani F.A., Anil S., Sudha PN. Development of 3D Scaffolds Using Nanochitosan/Silk-fibroin/Hyaluron Acid Biomaterials for Tissue Engineering Applications. 120 (2018) : 870-885.
- Gumgumjee, N.M., Shiekh H.M., Danial E.N. 2018. Antioxidant and Antibacterial Activity of Chitin, Chitosan and Shrimp Shells from Red Sea for Pharmaceutical Uses. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences.* 7 (1) : 1-8.
- Hanani, E., Mun'im, A., Sekarini, R. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons *Callyspongia sp* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian.* 2 (3) : 127–133.
- Haryati, N.A., CS. Erwin. 2015. Uji Toksisitas dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Merah (*Syzygium mytifolium Walp*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia Mulawarman.* 13 (1): 35-39
- George, Jestin K., Biba VK., Sujathan, Remani P. 2017. Nature's Gift For Various Remedies-A Review on the Different Medicinal Properties of *Annona muricata*. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research.* 4 (11) : 281-286.
- Hanani, E., Mun'im, A., Sekarini, R. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia sp* dari Kepulauan Seribu, *Majalah Ilmu Kefarmasian.* 2 (3) : 127–133.
- Handayani, H., and F.H. Sriherfyna. 2016. Ekstraksi Antioksidan Daun Sirsak Metode Ultrasonik Bath (Kajian Rasio Bahan : Pelarut dan Lama Ekstraksi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 4 (1): 262-272.
- Harborne, JB. 1996. *Metode Fitokimia*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, Terbitan II, ITB. Bandung.
- Hargono. 2008. Pembuatan Kitosan dari Limbah Cangkang Udang serta Aplikasinya dalam Mereduksi Kolesterol Lemak Kambing. *Reaktor Journal.* 12 (1) : 53-57.

- Hermawan AH, Eliyani, Tyasningsih W. 2007. Pengaruh ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Esherichia coli* dengan metode difusi disk. Surabaya: Universitas Airlangga. 3(3):1-9.
- Ibrahim, A.M., Yunita, HS. Feronika. 2015. Pengaruh Suhu dan Lama Waktu Ekstraksi Terhadap Sifat Kimia dan Fisik Pada Pembuatan Minuman Sari Jahe Merah dengan Kombinasi Penambahan Madu sebagai Pemanis. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3 (2):530-541.
- Immanuel. 2014. Efek Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) Terhadap *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* Secara *In Vitro*. Thesis tidak diterbitkan. Bandung: Bagian Mikrobiologi- Universitas Kristen Maranatha.
- Indah, N. 2009. *Taksonomi Tumbuhan Tingkat Rendah*. Jurusan Biologi Fakultas MIPA Ikip PGRI Jember.
- Jawetz, E., dkk. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi XXII* diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Salemba Medika: Jakarta.
- Ko JH., Yin HY., An JH., and Chung DJ. 2010. Characterization of Cross-Linked Gelatin through Electrospinning. *Journal Macromol Resc*. 18 (2) : 137-143.
- Komariah A. 2014. Efektivitas Antibakteri Nanokitosan terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* (in vitro). Seminar Nasional XI Pendidikan Biologi. FKIP-UNS.
- Kumar N., Mishra S., Ahmad S., Sharma B.K. 2013. *Annona muricata* (the cancer killer) : A Review. *Glob. Journal Pharm*. 2 (2) :1613–1618.
- Kumari R. and Dutta P.K. 2010. Physicochemical and Biological Activity Study of Genipin-Crosslinked Chitosan Scaffolds Prepared by Using Supercritical Carbon Dioxide for Tissue Engineering Applications. *Int. Journal Biol. Macromol*.46 (2) : 261-266.
- Kumoro, Andri Cahyo. 2015. Teknologi Ekstraksi Senyawa Bahan Aktif dari Tanaman Obat. Plantaxia : Yogyakarta.
- Kumiriska J., Weinhold M.X., Thoming J., and Stepnowski P. 2011. Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials-Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation. *Polymers*. 3 (1): 1875-1901.
- Kurniasih, N. 2015. Potensi Daun Sirsak (*Annona muricata L.*), Daun Binahong (*Anredera Fordifolia* (Ten) Steenis), dan Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe Pentandra*) sebagai Antioksidan Pencegah Kanker. ISSN 1979-8911. IX (1) : 9-17.

- Lawal, Z A, Hamid, A A, Shehu, A; god'shelp, E; ajibade, O S; subair, O A; ogheneovo, P; mukadam, A A. adebayo, C T. 2017. Biochemical Properties, *In-Vitro* Antimicrobial, and Free Radical Scavenging Activities of the Leaves of *Annona muricata*. 21 (6) : 124-130.
- Madigan MT, dkk. 2008. *Biology of Microorganisms 12th Edition*. San Francisco: Pearson.
- Mardiana, L., Adeanne. 2015. Biochemical Properties, *In-Vitro* Antimicrobial, And Free Radical Scavenging Activities Of The Leaves Of *Annona muricata* L. *Journal Appl. Sci. Environ*. 21 (6) : 1197-1201.
- Marliana, S.D., Saleh, C. 2011. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Fraksi *n*-Heksana, Etil asetat, dan Metanol dari Buah Labu Air (*Lagenari Siceraria (Morliana)*). *Jurnal Kimia Mulawarman*. 8 (2): 39-63
- Marrisa. 2017. Ukuran Partikel dan Efisiensi Penjerapan Nanopartikel Glukosamin Hidroklorida dengan Variasi Konsentrasi Kitosan. Thesis tidak diterbitkan. Jakarta : Fakultas Kedokteran – UIN Syarif Hidayatullah.
- Martien, R., Adhyatmika, Irianto, Iramie D. K., Farida, V., Sari, Dian Purwita. 2012. Perkembangan Teknologi Nanopartikel Sebagai Sistem Penghantaran Obat. *Majalah Farmasetik*, Vol. 8 No. 1 Tahun 2012.
- Mayas MA dan Al-Remawi. 2012. Properties of Chitosan Nanoparticles formed Using Sulfate Anions as Crosslinking Bridges. *American Journal of Applied Sciences*. 9(7):1091-1100.
- McGee, S.A., Sharee, A.W., and Jane, D.P. 2006. What Advanced Practice About Free Radicals. *The Internet Journal of Advance Nursing Practise*, Kansas, 6 (1): 1-9.
- McMurry, J. and Fay, R.C.. 2004. McMurry Fay Chemistry. 4th edition. Belmont, CA. : Pearson Education International.
- Mohanraj dan Chen. 2006. *Nanoparticles – A Review*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 5 (1) : 561-573.
- Molyneux, P., 2004. The Use Of The Stable Free Radikal Diphenyl Picrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activit. *Journal Science of Technology*. 26 (2): 211-219.
- Muzzarelli R.A.A. 2012. Nanochitins and Nanochitosans, Paving the Way to Eco-Friendly and Energy-Saving Exploitation of Marine Resources. In *Polymer Science : A Comprehensive Reference*, Maty-Jaszewski, K., Elsevier, Amsterdam. *The Netherlands Journal*. 10 (1) : 153-164.

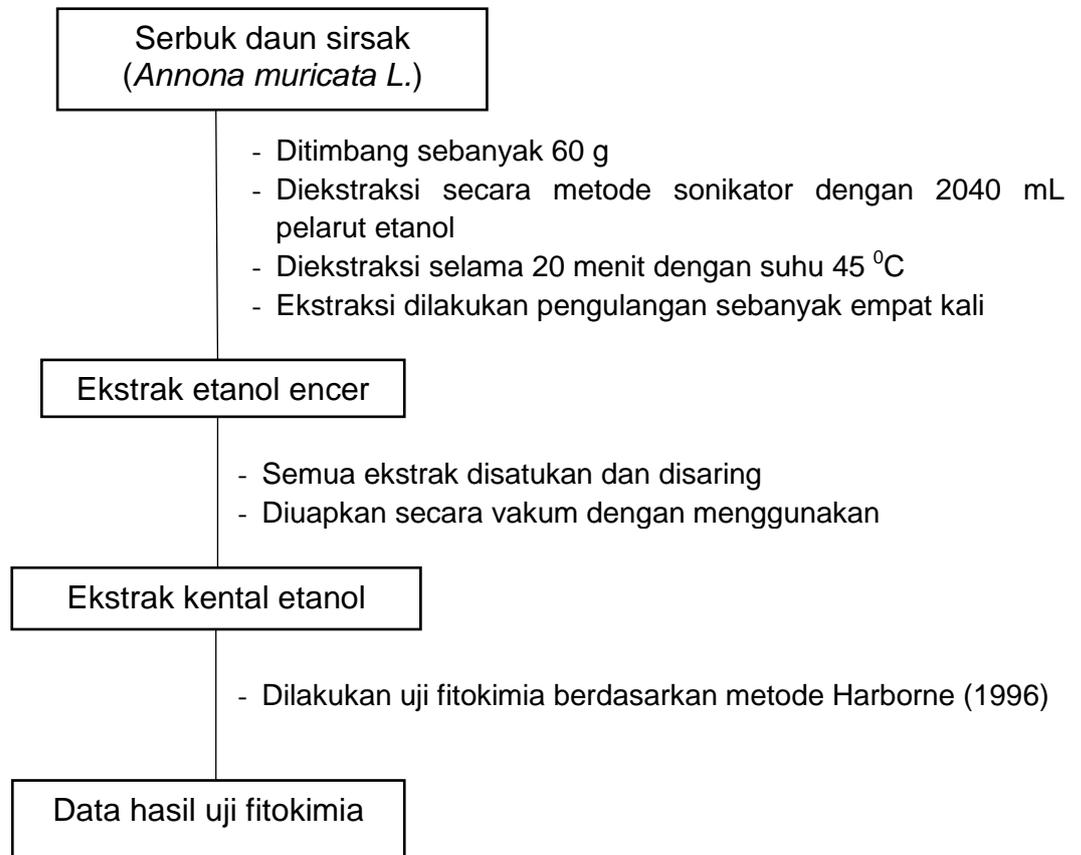
- Muzzarelli, R.A.A., Ravi, M.N.V., Muzzarelli C., Sashiwa. H., Domb, A.J. 2012. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Review*. 104(56): 6017-6084.
- Nadia, L.M., Suptijah, P., Ibrahim B. 2014. Produksi dan Karakterisasi Nanokitosan dari Cangkang Udang Windu dengan Metode Gelasi Ionik. *JPHPI*. 17 (2) : 119-126.
- Najmuddin, S. U. F., Alitheen, N. B., Hamid, M. and Nik Abd Rahman, N. M. A. 2017. Comparative Study of Antioxidant Level and Activity From Leaf Extracts Of *Annona muricata* Linn Obtained from Different Locations. *Pertanika Journal. Trop. Agric. Sci.* 40 (1): 119 – 130.
- Natsir H., Rauf A.P., Maggy T.s., dan Ahyar A. 2010. Production and Characterization of Chitinase Enzyme From Sulili Hot Spring in South Sulawesi, *Bacillus sp.Indo*, *Journal Chem.* 10 (2): 263-267.
- Noller, B. 2005. *Technical Data Report for Graviola (A. muricata* Linn). Sage Press, Inc. Austin.
- Nugrahani, R., Andayani Y., Hakim A. 2016. Skrining Fitokimia dari Ekstrak Buah Buncis (*Phaseolus vulgaris L.*) dalam Sediaan Serbuk. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*. 2(1) : 97-103
- Olugbuyiro, J. A. O., Anuoluwapo S., Banwo, Alaba O., Adeyemi, Olugbenga S., Taiwo, Oyeronke A., Akintokun. 2017. Antimicrobial Activities And Phytochemical Properties Of *Annona muricata* L. Leaf. *Covenant Journal Of Physical & Life Sciences (CJPL)*. 5 (2): 2354 – 3485.
- Pasaribu, S. 2009. Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder dari Daun Tumbuhan Bandotan. *Jurnal Kimia Mulawarman*. 6 (1) : 81-86.
- Patravale, V.B., Date, A.A., Kulkarni, R.M. 2004. Nanosuspensions: a Promising Drug Delivery Strategy. *Journal Pharm Pharmacol*. 56 (7) : 827-40.
- Pelczar dan Chan.1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 2*. Jakarta : UI-press.
- Pelczar, M. J. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI-press: Jakarta.
- Perwiratami,C., M.Suzery., B.Cahyono. 2014. *Korelasi Total Fenolat dan Total Flavonoid dengan Antioksidan dari Beberapa sediaan Ekstrak Buah Tanjung (Mimusoup elengi)*.7(1):34-38.
- Purwoko, T. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Bumi Aksara : Jakarta.
- Rajeshwari K., Latha S., Gomathi T., Sangeetha K., Sudha P.N. 2016. Preparation and Characterisation Study of Nanochitosan (NCS) and Polyvinyl Alcohol (PVA) Binary Blends with Glutraldehyde as A Crosslinking Agent. *Der Pharmacia Lettre*. 8 (19) :485-495.

- Rampino A., Borgogna M, Blasi P, Bellich B., Cesaro A. 2013. Chitosan nanoparticles : Preparation, Size Evolution and Stability. *Int Journal Pharm.* 455 (1-2) : 219-228.
- Riski, Radhia dan Fitriyanti Jumaetri Sami. 2015. Formulasi Krim Anti Jerawat Dari Nanopartikel Kitosan Cangkang Udang Windu (*Penaeus monodon*). *JF FIK UINAM.* 3(4): 153 – 161.
- Risky TA dan Suyatno. 2014. Aktivitas Antioksidan dan Antikanker Ekstrak Metanol Tumbuhan Paku *Adiantum philippensis* L. *Journal of Chemistry.* 3 (1) : 89-95.
- Rosemary I. Uchegbu, Kalu U. Ukpai, Irenus C. Iwu and Jacinta N. Akalazu. 2017. Evaluation of the Antimicrobial Activity and Chemical Composition of The Leaf Extract of *Annona muricata* L. (Soursop) Grown In Eastern Nigeria *Uchegbu Et Al. ACRI.* 7 (1) : 1-8.
- Sabir A. 2005. In vitro Antibacterial Activity of Flavonoids Trigona sp Propolis Against *Streptococcus mutans*. *Dental Journal.* 38(3):135-41.
- Saija, A. 1995. *Flavonoids as Antioxidant Agents :Importance of Their Interaction with Biomembranes.* Free Radic.Biol. & Med. 19 (4) : 481-486
- Samar, M.M., El-Kalyoubi MH., Khalaf MM., El-Razik MM Abd. 2013. Physicochemical, Functional, Antioxidant and Antibacterial Properties of Chitosan Extracted from Shrimp Wastes by Microwave Technique. *Annals of Agricultural Science Journal.* 58 (1): 33–41.
- Sangi, M., M.R.J. Runtuwene., H.E.I. Simbala, dan V.M.A. Makang. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chem. Prog.* 1(1): 47-53
- Saraswaty. 2013. Aktivitas Antioksidan dari Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Manggis, Daun Sirsak, dan Daun Sirih Merah. *Proceeding Seminar Ilmu Pengetahuan Teknik 2013.* Pusat Penelitian Kimia LIPI Sangkuriang Bandung.
- Saravananbhavan S.S., Bose R., Skylab S., Dharmalingam S. 2013. Fabrication of Chitosan/TPP Nanoparticles as A Carrier Towards Threathmnt of Cancer. *Int. Journal Drug Deliv.* 5 (1): 35-42.
- Sari, Dewi P., Damajanty HCP., Juliatri. 2016. Uji Daya Hambat Ekstrak Alga Coklat (*Padina australis* Hauck) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Porphyromonas gingivalis* secara *In Vitro*. *Jurnal e-Gigi.* 4 (2) : 140 – 144.
- Sari, SR., Baehaki,A., Lestari, SD. 2013. Aktivitas Antioksidan Kompleks Kitosan Monosakarida. *Fistech Journal.* 11 (1) : 69-73.

- Sayuti, K., dan Yenrina, R. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Andalas University Press: Padang.
- Setiabudi DA dan Tukiran. 2017. Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Klampok Watu (*Syzygium litorale*). *UNESA Journal of Chemistry*. 6(3) : 155-160.
- Setiyanto. 2012. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air Teripang Pasir (Holothuria scarba) dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (Dpph) dan Analisis Kandungan Kimianya*. Tesis tidak diterbitkan. Surakarta : Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Setyowati, W.A.E, dkk. 2014. Skrining Fitokimia dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Varietas Petruk. *Jurnal Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VI*. ISBN ( 979363175-0): 271-280
- Sugita P., Wukirsari T., Sjahriza A., dan Wahyono D. 2009. *Kitosan Sumber Biomaterial Masa Depan*. IPB Press : Bogor.
- Sulastrianah. 2014. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dan Daun Sirih (*Piper betle* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. Tesis tidak diterbitkan. Kendari : Farmakologi FK UHO
- Sumantri, Indro; Hermawan; Laksono. 2014. Ekstraksi Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Menggunakan Pelarut Etanol. *Momentum*. 10, (1) : 34-37.
- Sumadiyasa, M dan Manuaba IBS. 2018. Penentuan Ukuran Kristal Menggunakan Formula Scherrer, Williamson-Hull Plot, dan Ukuran Partikel SEM. *Buletin Fisika*. 19 (1) : 28-34.
- Sumardika dan Jawi. 2012. *Water Extract of Sweet Potato Leaf Improved Lipid Profile and Blood SOD Content of Rats with High Chlorestrol Diet*. *Medicina*. 43 (2) : 2540-2550.
- Sunarjono H. 2005. Sirsak dan Srikaya : Budi Daya untuk Menghasilkan Buah Prima. Penebar Swadaya : Bogor.
- Suptijah P., Jacob MA., Rachmania D. 2011. Karakterisasi Nano Kitosan Cangkang Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) dengan Metode Gelasi Ionik. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 14 (2): 78-84.
- Suwarda R, Maarif MS. 2012. Pengembangan Inovasi Teknologi Nanopartikel Berbasis Pati Untuk Menciptakan Produk Yang Berdaya Saing. *Jurnal Teknik Industri* 13(2):105-122.
- Svehla, G. 1990. Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro. Edisi kelima, diterjemahkan oleh Setiono, L & Pudjaatmaka, A. H. Jakarta : Media Pusaka.

- Takahashi, J.A., Cássia R. P., Lúcia P. S., Pimenta, Maria A. D. Boaventura dan Luiz G. F., Silva E. 2016. Antibacterial Activity of Eight Brazilian Annonaceae Plants. *Natural Product Research Journal*. 20 (1) : 21-26.
- Tristantini, D., Ismawati, A., Pradana, B. T., dan Jonathan, J. G., 2016, Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L), *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan" Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*, Yogyakarta.
- Tuna, M.R. dkk, 2015. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*. *Pharmaconjournal Ilmiah Farmasi – UNSRAT* ISSN 2302 – 2493.KES MAS. 4 (3) : 144 – 239.
- Vinsova, J., dan Vavrikova, E. 2011. Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities – a Review. *Current Pharmaceutical Design*. 17(1): 3596-3607.
- Volk, W. A. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Erlangga: Jakarta.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisiusm: Yogyakarta.
- Winarti, S. 2010. *Makanan Fungsional*. Graha Ilmu: Yogyakarta.
- Wulandari N. 2008. *Uji Antibakteri Kitosan dari Kulit Udang Windu (Penaeus monodon) dengan Metode Difusi Cakram Disk*. Skripsi tidak diterbitkan. Semarang : Jurusan Kimia FMIPA-UNDIP.
- Wullur, A.C., Schaduw J., Wardhani, A.N.K. 2015. Identifikasi Alkaloid pada Daun Srsak (*Annona muricata* L.). 9 (6) : 54-56.
- Younes I., Sellimi S., Rinaudo M., Jellouli K., Nasri M. 2014. Influence of Acetylation Degree and Molecular Weight of Homogeneous Chitosans on Antibacterial and Antifungal Activities. *Int. Journal Food Microbiol*. 18 (185) : 57-63.
- Yuliantari, N.W.A., Widarta I W.R., Permana I D.G.M. 2017. Pengaruh Suhu dan Waktu Ekstraksi Terhadap Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Menggunakan Ultrasonik. *Scientific Journal of Food Technology*. 4 (1) : 35-42.
- Zuhud, A.M. 2011. *Manfaat Daun Sirsak*. Agro Media : Jakarta.

# Lampiran

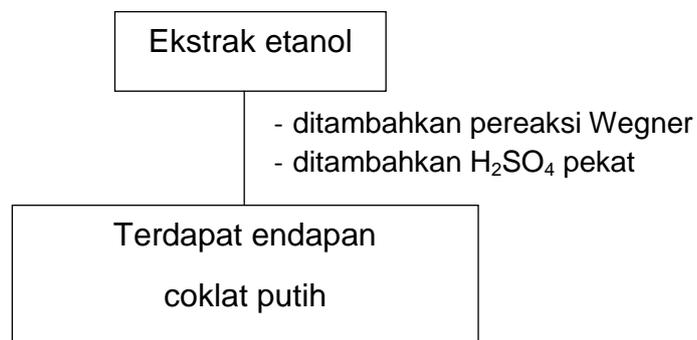
**Lampiran 1.** Bagan kerja ekstraksi daun sirsak (*Annona muricata* Linn.)

## Lampiran 2. Bagan uji fitokimia

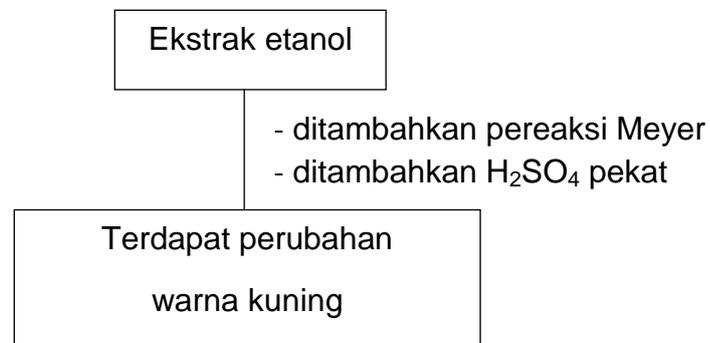
### A. Uji fitokimia ekstrak etanol

#### 1. Uji alkaloid

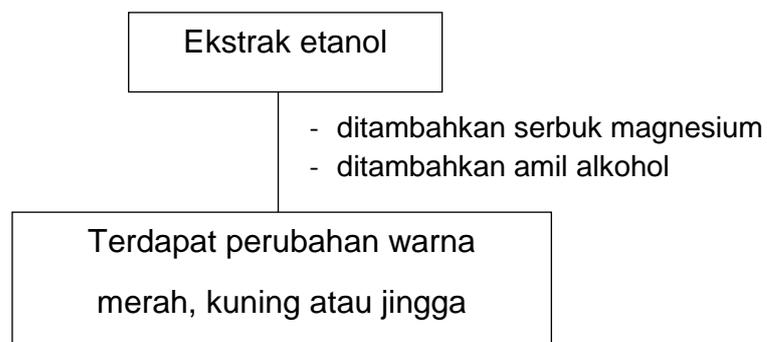
##### ❖ Uji Wegner



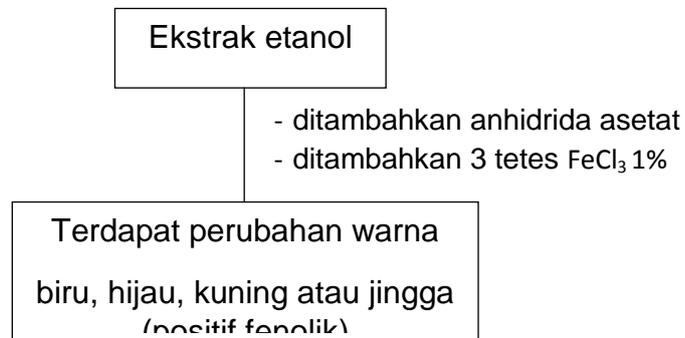
##### ❖ Uji Meyer



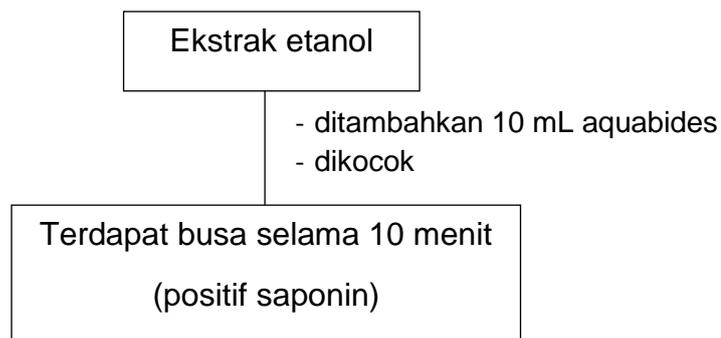
#### 2. Uji Flavonoid



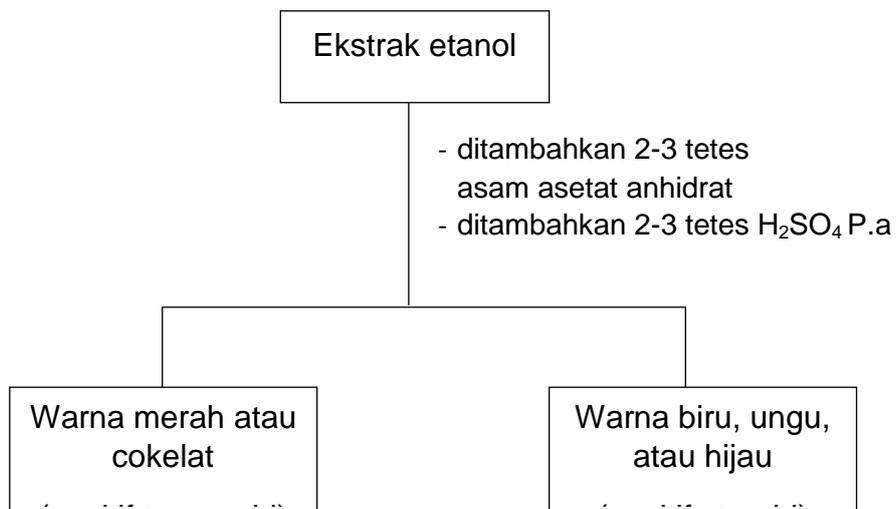
### 3. Uji Fenolik

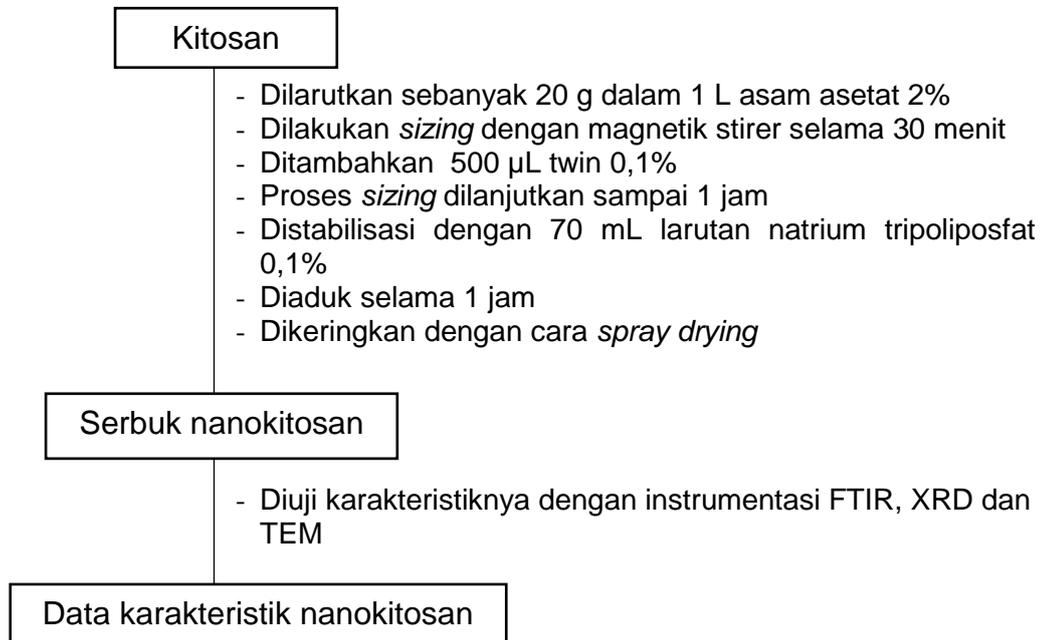


### 4. Uji Saponin

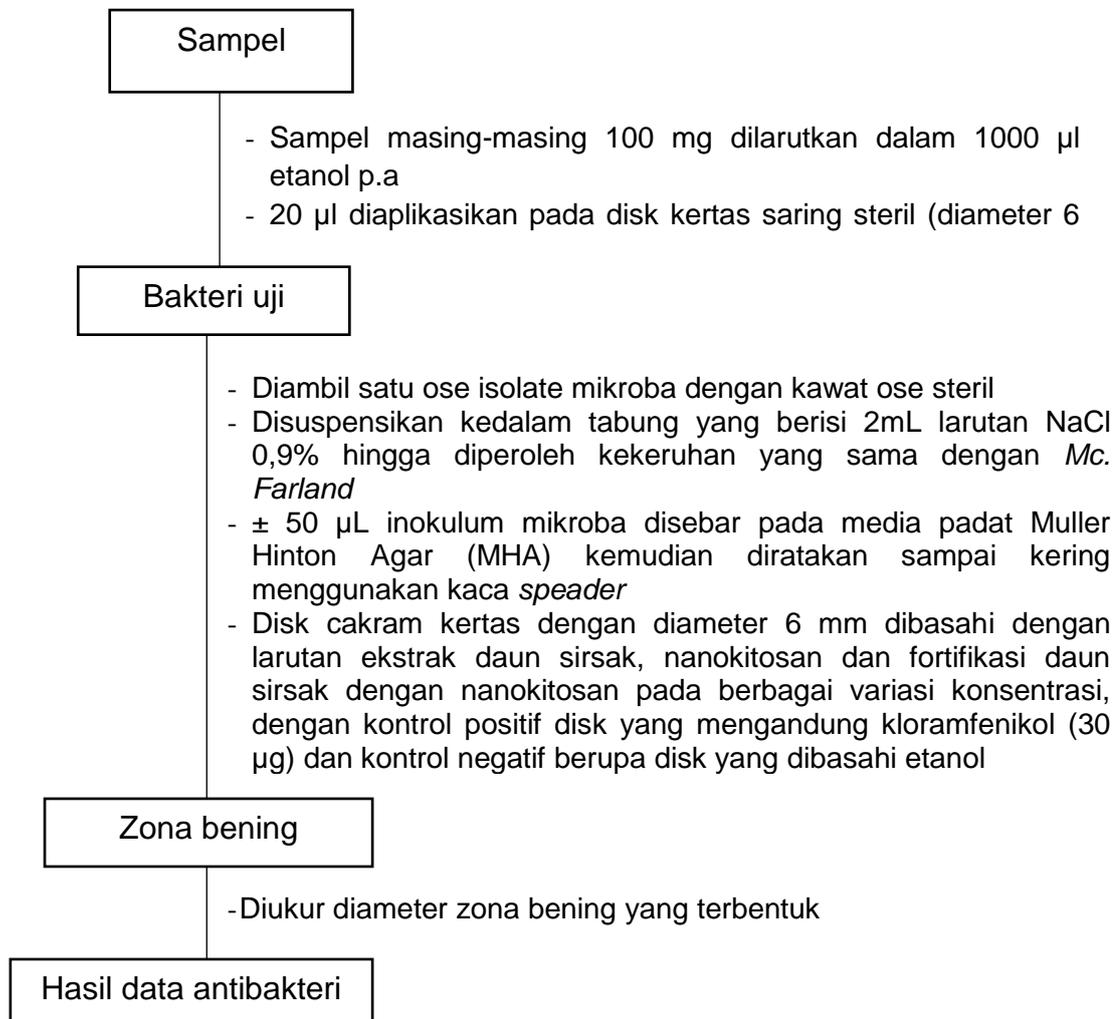


### 5. Uji Terpenoid dan Steroid (Pereaksi Liebermann-Burchard)



**Lampiran 3.** Bagan kerja proses pembuatan nanokitosan

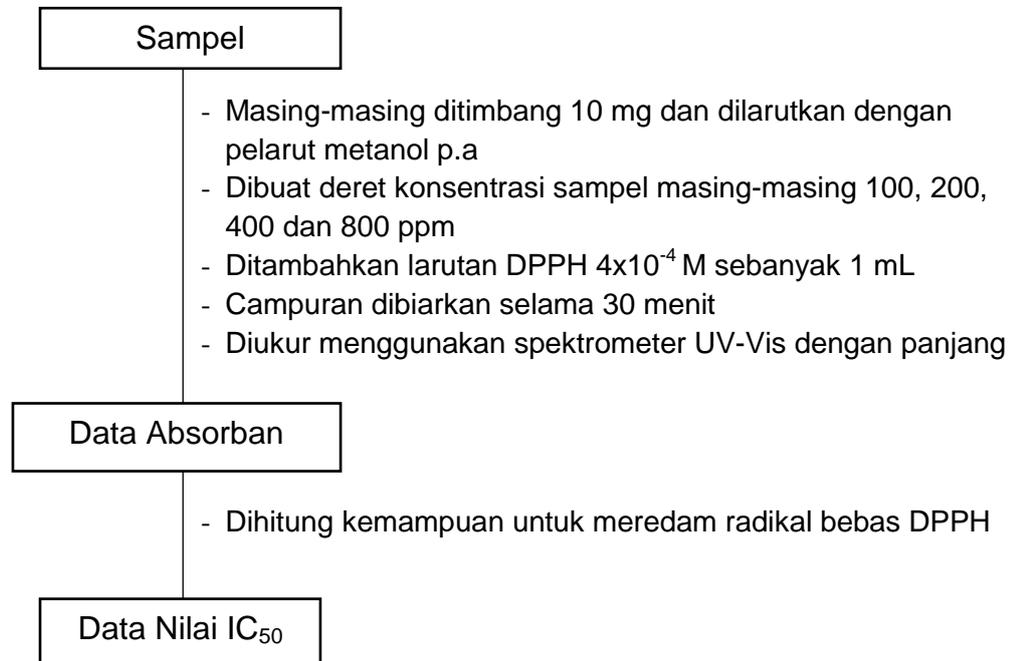
**Lampiran 4.** Bagan kerja uji antibakteri ekstrak daun sirsak, nanokitosan dan fortifikasi ekstrak daun sirsak dengan nanokitosan



**Catatan :**

1. Sampel penelitian yang digunakan adalah ekstrak daun sirsak, nanokitosan, hasil fortifikasi ekstrak daun sirsak dengan nanokitosan, kontrol positif berupa disk yang dibasahi antibiotik kloramfenikol dan kontrol negatif berupa disk yang dibasahi etanol.
2. Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri *Staphylococcus aureus* (gram positif) dan *Eschericia coli* (gram negatif).

**Lampiran 5.** Bagan kerja uji antioksidan ekstrak daun sirsak, nanokitosan dan fortifikasi ekstrak daun sirsak dengan nanokitosan

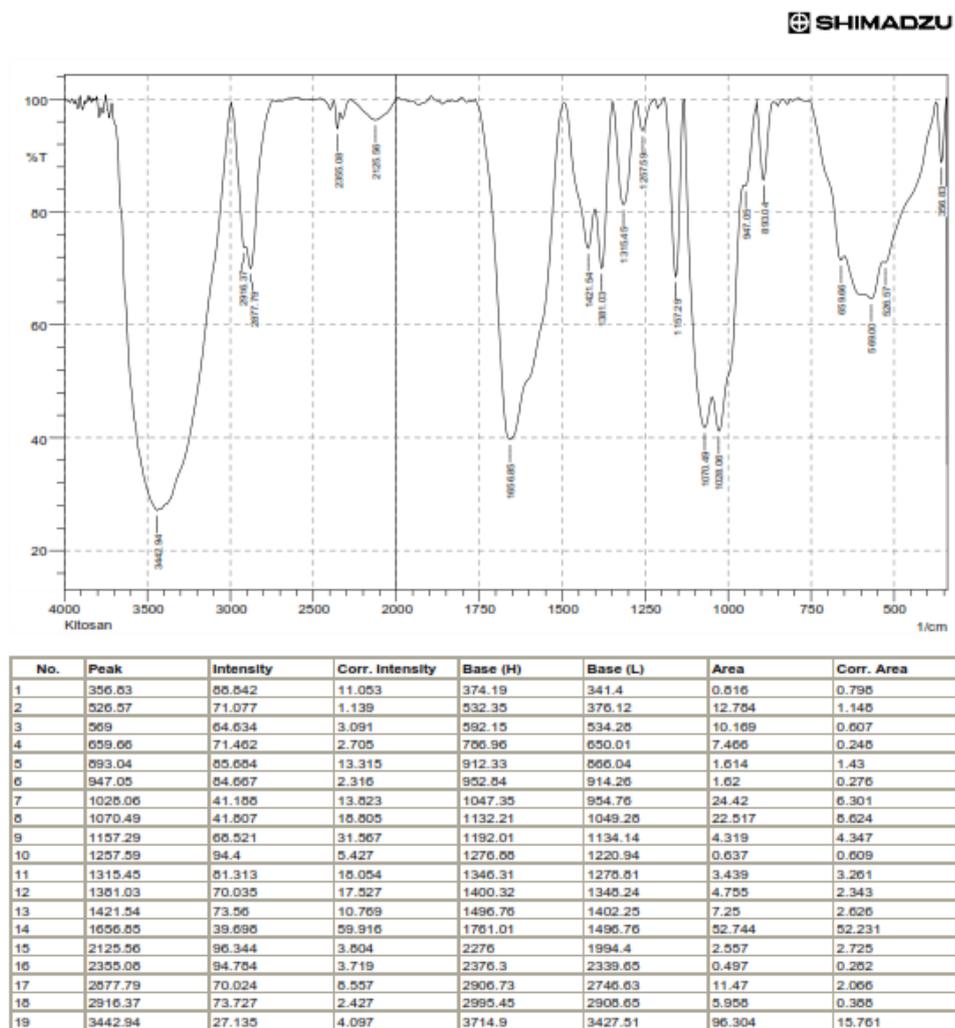


**Catatan :**

Sampel penelitian yang digunakan adalah ekstrak daun sirsak, nanokitosan, hasil fortifikasi ekstrak daun sirsak dengan nanokitosan, kontrol positif berupa larutan asam askorbat.

## Lampiran 6. Spektroskopi FTIR pada kitosan, NaTPP dan nanaokitosan

### 1. Kitosan

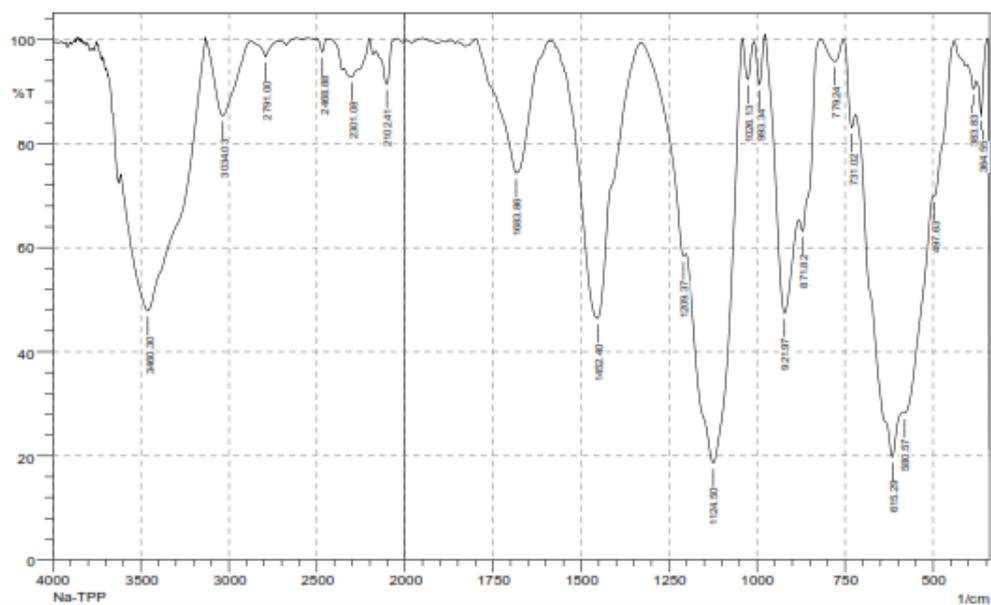


Comment;  
Kitosan

Date/Time; 3/14/2019 3:42:29 PM  
No. of Scans;  
Resolution;  
Apodization;

## 2. Na-TPP

SHIMADZU



No.	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	364.55	85.44	10.142	376.05	347.19	1.067	0.556
2	383.83	90.469	2.277	403.12	376.05	0.642	0.119
3	497.63	69.905	1.011	499.56	441.7	4.666	0.389
4	590.57	26.186	2.93	506.36	501.49	31.332	1.973
5	615.29	19.617	20.247	719.45	586.29	54.866	14.393
6	731.02	83.023	6.796	754.17	721.36	1.67	0.52
7	779.24	95.763	4.249	819.75	756.1	0.655	0.664
8	815.29	63.159	7.771	861.47	821.66	6.734	1.642
9	821.97	47.412	32.697	975.96	883.4	17.976	9.395
10	893.34	91.355	6.924	1006.77	977.91	0.575	0.613
11	1026.13	92.312	7.556	1041.56	1006.77	0.576	0.557
12	1124.5	16.643	60.054	1201.65	1041.56	66.316	50.105
13	1209.37	56.39	2.207	1326.95	1203.56	10.661	0.147
14	1452.4	46.409	52.46	1566.13	1330.66	30.924	29.767
15	1683.06	74.329	1.107	1795.73	1660	6.996	-0.336
16	2102.41	91.433	7.647	2164.13	2067.69	1.96	1.476
17	2301.06	92.606	0.52	2314.56	2274.07	1.217	0.047
18	2466.06	97.561	2.514	2497.62	2443.61	0.231	0.253
19	2791	96.666	3.023	2875.66	2711.92	0.924	0.7
20	3034.03	65.359	14.552	3130.47	2875.66	6.656	6.694
21	3460.3	47.671	34.503	3612.67	3132.4	95.103	64.2

Comment;  
Na-TPP

Date/Time; 3/14/2019 3:28:23 PM  
No. of Scans;  
Resolution;  
Apodization;

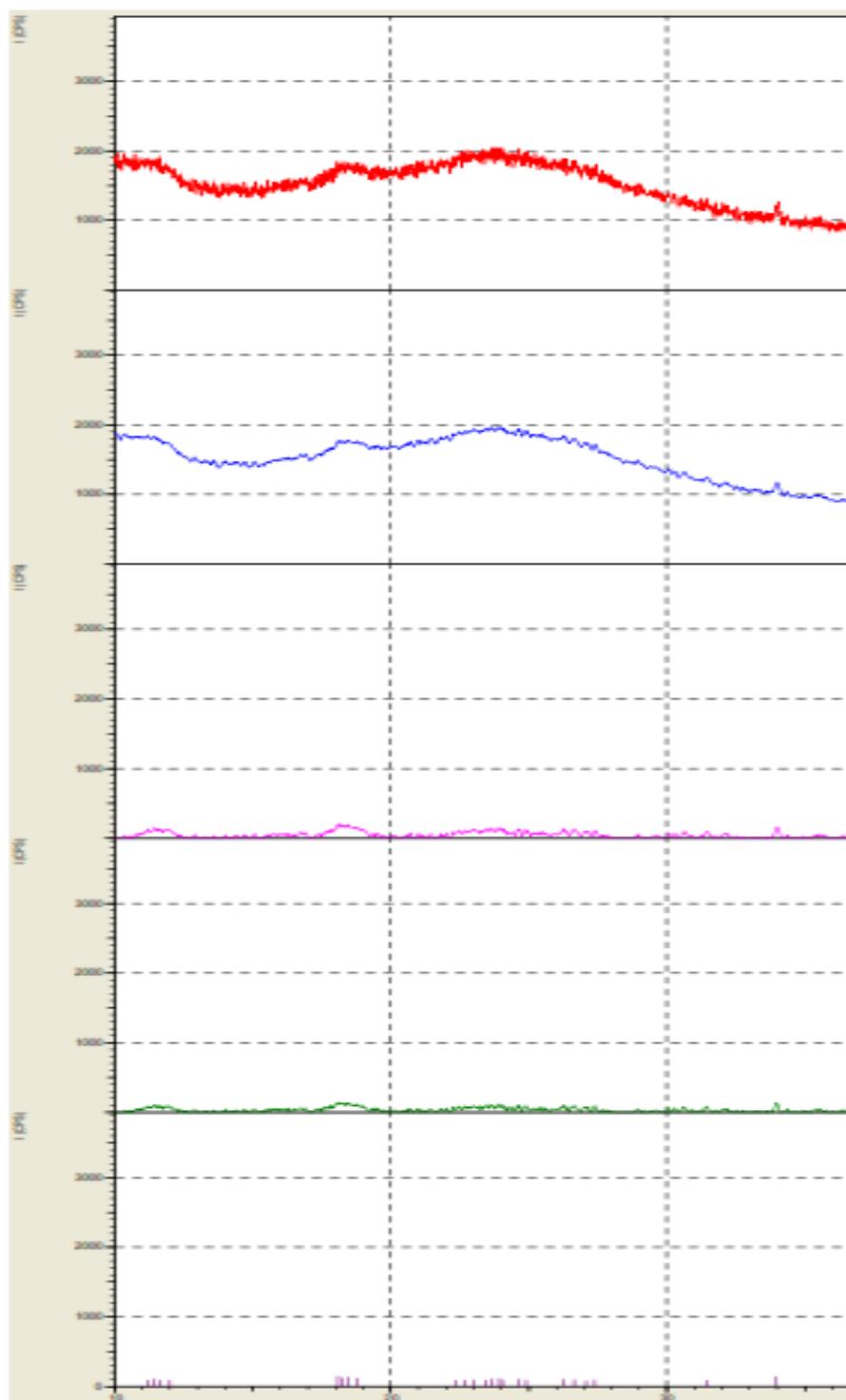


## Lampiran 7. Diameter pada XRD

Perhitungan diameter partikel hasil analisis X-Ray Diffraction (XRD)

No	2 theta	$\Theta$	FWHM	k	$\lambda$ (nm)	$\cos \Theta$	$k \times \lambda$	$\beta$	$\beta \cos \Theta$	Diameter (nm)
1	11.2000	5.60	0.33	0.98	0.1540	0.9952	0.15092	0.0057	0.0057	26.44
2	11.4200	5.71	0.00	0.98	0.1540	0.9950	0.15092	0.0000	0.0000	
3	11.6200	5.81	0.00	0.98	0.1540	0.9949	0.15092	0.0000	0.0000	
4	12.0000	6.00	0.37	0.98	0.1540	0.9945	0.15092	0.0065	0.0064	23.51
5	18.0800	9.04	0.26	0.98	0.1540	0.9876	0.15092	0.0045	0.0044	33.93
6	18.2400	9.12	0.00	0.98	0.1540	0.9873	0.15092	0.0000	0.0000	
7	18.4400	9.22	0.00	0.98	0.1540	0.9871	0.15092	0.0000	0.0000	
8	18.7800	9.39	0.62	0.98	0.1540	0.9866	0.15092	0.0108	0.0107	14.10
9	22.3731	11.19	0.32	0.98	0.1540	0.9810	0.15092	0.0056	0.0055	27.36
10	22.7000	11.35	0.29	0.98	0.1540	0.9804	0.15092	0.0051	0.0050	30.43
11	23.0200	11.51	0.34	0.98	0.1540	0.9799	0.15092	0.0059	0.0058	25.97
12	23.4600	11.73	0.51	0.98	0.1540	0.9791	0.15092	0.0088	0.0087	17.44

13	23.6800	11.84	0.15	0.98	0.1540	0.9787	0.15092	0.0026	0.0025	60.30
14	23.9200	11.96	0.27	0.98	0.1540	0.9783	0.15092	0.0048	0.0047	32.35
15	24.0400	12.02	0.19	0.98	0.1540	0.9781	0.15092	0.0032	0.0032	47.81
16	24.6232	12.31	0.15	0.98	0.1540	0.9770	0.15092	0.0026	0.0026	58.60
17	24.8958	12.45	0.20	0.98	0.1540	0.9765	0.15092	0.0034	0.0033	45.43
18	26.2420	13.12	0.23	0.98	0.1540	0.9739	0.15092	0.0039	0.0038	39.32
19	26.6438	13.32	0.27	0.98	0.1540	0.9731	0.15092	0.0048	0.0046	32.64
20	27.0661	13.53	0.26	0.98	0.1540	0.9722	0.15092	0.0045	0.0044	34.60
21	27.3833	13.69	0.11	0.98	0.1540	0.9716	0.15092	0.0020	0.0019	78.59
22	31.4371	15.72	0.13	0.98	0.1540	0.9626	0.15092	0.0022	0.0021	71.50
23	33.9757	16.99	0.15	0.98	0.1540	0.9563	0.15092	0.0026	0.0025	60.88

**Lampiran 8.** Data spektrum XRD nanokitosan

## \*\*\* Basic Data Process \*\*\*

Group : Standard  
 Data : kiTosanHACITRa

# Strongest 3 peaks							
no.	peak no.	2Theta (deg)	d (Å)	I/I1	FWHM (deg)	Intensity (Counts)	Integrated (Counts)
1	27	44.0418	2.05444	100	0.17900	1508	14070
2	32	64.4023	1.44551	91	0.20780	1376	15311
3	25	39.5257	2.27813	28	0.14810	426	3727

# Peak Data List							
peak no.	2Theta (deg)	d (Å)	I/I1	FWHM (deg)	Intensity (Counts)	Integrated (Counts)	
1	11.2000	7.89380	3	0.32880	51	1338	
2	11.4200	7.74222	4	0.00000	61	0	
3	11.6200	7.60941	3	0.00000	52	0	
4	12.0000	7.36928	3	0.37000	51	1520	
5	18.0800	4.90250	6	0.25820	85	2000	
6	18.2400	4.85985	5	0.00000	72	0	
7	18.4400	4.80759	5	0.00000	77	0	
8	18.7800	4.72131	5	0.62180	68	2700	
9	22.3731	3.97054	3	0.32230	49	912	
10	22.7000	3.91409	3	0.29000	51	568	
11	23.0200	3.86040	4	0.34000	53	765	
12	23.4600	3.78898	3	0.50660	51	936	
13	23.6800	3.75428	4	0.14660	62	302	
14	23.9200	3.71715	5	0.27340	68	570	
15	24.0400	3.69886	4	0.18500	54	615	
16	24.6232	3.61256	4	0.15110	59	621	
17	24.8958	3.57362	4	0.19500	54	930	
18	26.2420	3.39327	4	0.22590	59	1059	
19	26.6438	3.34300	4	0.27240	56	699	
20	27.0661	3.29179	3	0.25720	46	547	
21	27.3833	3.25438	4	0.11330	53	440	
22	31.4371	2.84336	3	0.12570	50	554	
23	33.9757	2.63649	5	0.14860	79	746	
24	37.8181	2.37698	21	0.19540	311	3756	
25	39.5257	2.27813	28	0.14810	426	3727	
26	43.7200	2.06881	6	0.14220	87	1361	
27	44.0418	2.05444	100	0.17900	1508	14070	
28	44.2800	2.04394	6	0.09640	98	1184	
29	57.4817	1.60196	25	0.17540	384	3744	
30	57.8335	1.59305	5	0.10800	77	424	
31	64.0200	1.45321	4	0.10220	55	563	
32	64.4023	1.44551	91	0.20780	1376	15311	
33	64.7000	1.43957	6	0.12340	91	1067	

## Lampiran 9. Perhitungan aktivitas antimikroba

### Pembuatan larutan uji

#### 1. Ekstrak *A. muricata* L.

$$\text{a. Konsentrasi } 250 \mu\text{g/mL} = \frac{0,0025 \text{ gr}}{10 \text{ mL}}$$

$$\text{b. Konsentrasi } 125 \mu\text{g/mL} = \frac{0,125 \text{ mg}}{10 \text{ mL}}$$

$$\text{c. Konsentrasi } 62,5 \mu\text{g/mL} = \frac{0,625 \text{ mg}}{10 \text{ mL}}$$

$$\text{d. Konsentrasi } 31,25 \mu\text{g/mL} = \frac{0,3125 \text{ mg}}{10 \text{ mL}}$$

$$\text{e. Konsentrasi } 15,625 \mu\text{g/mL} = \frac{0,1563 \text{ mg}}{10 \text{ mL}}$$

#### 2. Nanokitosan

$$\text{a. Konsentrasi } 10 \text{ mg/mL} = \frac{200 \text{ mg}}{10 \text{ mL}}$$

$$\text{b. Konsentrasi } 5 \text{ mg/mL} = \frac{50 \text{ mg}}{10 \text{ mL}}$$

$$\text{c. Konsentrasi } 2,5 \text{ mg/mL} = \frac{25 \text{ mg}}{10 \text{ mL}}$$

$$\text{d. Konsentrasi } 1,25 \text{ mg/mL} = \frac{12,5 \text{ mg}}{10 \text{ mL}}$$

#### 3. Fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan (240 $\mu\text{g/mL}$ )

- Fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 1 : 1

$$= 0,003 \text{ gr} + 0,003 \text{ gr}$$

$$= 0,006 \text{ gr} = 6 \text{ mg} \Rightarrow 240 \text{ ppm}$$

$$\text{Ppm} = \frac{mg}{L}$$

$$240 = \frac{6 \text{ mg}}{L}$$

$$L = \frac{6 \text{ mg}}{240} = 0,025L = 25 \text{ mL}$$

- Fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 2 : 1

$$= 0,006 \text{ gr} + 0,003 \text{ gr}$$

$$= 0,009 \text{ gr} = 9 \text{ mg} \Rightarrow 240 \text{ ppm}$$

$$\text{Ppm} = \frac{mg}{L}$$

$$240 = \frac{9 \text{ mg}}{L}$$

$$L = \frac{9 \text{ mg}}{240} = 0,0375L = 37,5 \text{ mL}$$

- Fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 3 : 1

$$= 0,009 \text{ gr} + 0,003 \text{ gr}$$

$$= 0,012 \text{ gr} = 12 \text{ mg} \Rightarrow 240 \text{ ppm}$$

$$\text{Ppm} = \frac{mg}{L}$$

$$240 = \frac{12 \text{ mg}}{L}$$

$$L = \frac{12 \text{ mg}}{240} = 0,05L = 50 \text{ mL}$$

- Fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 1 : 2

$$= 0,003 \text{ gr} + 0,006 \text{ gr}$$

$$= 0,009 \text{ gr} = 9\text{mg} \Rightarrow 240 \text{ ppm}$$

$$\text{Ppm} = \frac{mg}{L}$$

$$240 = \frac{9 \text{ mg}}{L}$$

$$L = \frac{9 \text{ mg}}{240} = 0,0375\text{L} = 37,5 \text{ mL}$$

- Fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 1 : 3

$$= 0,003 \text{ gr} + 0,009 \text{ gr}$$

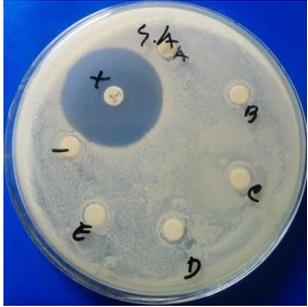
$$= 0,012 \text{ gr} = 12 \text{ mg} \Rightarrow 240 \text{ ppm}$$

$$\text{Ppm} = \frac{mg}{L}$$

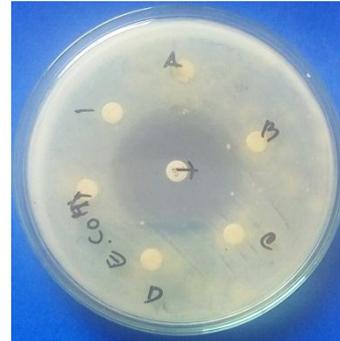
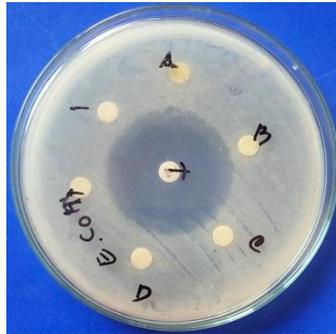
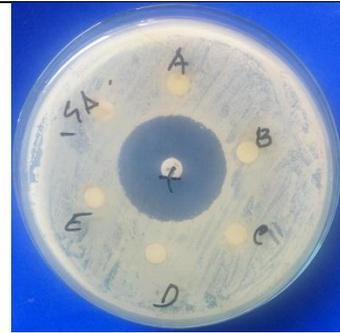
$$240 = \frac{12 \text{ mg}}{L}$$

$$L = \frac{12 \text{ mg}}{240} = 0,05\text{L} = 50 \text{ mL}$$

### Hasil Uji aktivitas antibakteri

	Pengamatan 24 Jam	Pengamatan 48 Jam
<p>Ekstrak Daun <i>A. muricata</i> L.</p> 	 	 
<p>Nanokitosan</p> 	 	 

Fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan



### Lampiran 10. Perhitungan aktivitas antioksidan

#### Perhitungan Pengenceran Konsentrasi Sampel

##### 1. Ekstrak Daun *A. muricata* L.

Konsentrasi (ppm)	Volume sampel (mL)	Volume DPPH (mL)	Volume metanol (mL)	Volume total
10	2.5	1	6.5	10
20	1	1	8	10
40	5	1	4	10
80	5	1	4	10
160	8	1	1	10

Perhitungan:

Konsentrasi larutan induk sampel adalah 200 ppm

Kontrol : 1 mL DPPH + 4 mL metanol

- Untuk konsentrasi 160 ppm:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V_1 \times 200 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 160 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 8 \text{ mL}$$

- Untuk konsentrasi 80 ppm:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V_1 \times 200 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 80 \text{ ppm}$$

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

- Untuk konsentrasi 40 ppm:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V_1 \times 200 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 40 \text{ ppm}$$

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

- Untuk konsentrasi 20 ppm:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V_1 \times 20 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 20 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL}$$

- Untuk konsentrasi 10 ppm:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V_1 \times 20 \text{ ppm} = 5 \text{ mL} \times 10 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL}$$



Gambar aktivitas antioksidan daun *A. muricata* L.

## 2. Nanokitosan

Konsentrasi (ppm)	Volume sampel (mL)	Volume DPPH (mL)	Volume metanol (mL)	Volume total
500	2,5	1	6,5	10
1000	5	1	4	10
2000	5	1	4	10
4000	5	1	4	10
8000	8	1	1	10

Perhitungan:

Konsentrasi larutan induk sampel adalah 10.000 ppm

Kontrol : 1 mL DPPH + 4 mL methanol

- Untuk konsentrasi 10.000 ppm:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V_1 \times 10.000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 8000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 8 \text{ mL}$$

- Untuk konsentrasi 4000 ppm:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V_1 \times 8000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 4000 \text{ ppm}$$

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

- Untuk konsentrasi 2000 ppm:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V_1 \times 4000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 2000 \text{ ppm}$$

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

- Untuk konsentrasi 1000 ppm:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V_1 \times 2000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 1000 \text{ ppm}$$

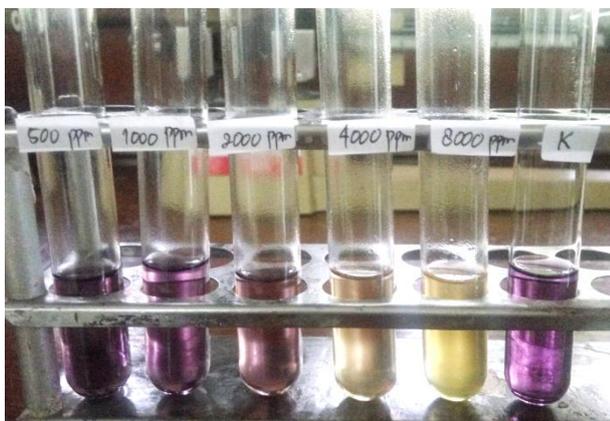
$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

- Untuk konsentrasi 500 ppm:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V_1 \times 1000 \text{ ppm} = 5 \text{ mL} \times 500 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL}$$



Gambar aktivitas antioksidan nanokitosan

### 3. Fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan

**(Larutan induk masing-masing = 500 ppm)**

- Fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 1 : 1

$$= 0,003 \text{ gr} + 0,003 \text{ gr}$$

$$= 0,006 \text{ gr} = 6 \text{ mg} \Rightarrow 500 \text{ ppm}$$

$$\text{Ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$500 = \frac{6 \text{ mg}}{\text{L}}$$

$$\text{L} = \frac{6 \text{ mg}}{500} = 0,012 \text{ L} = 12 \text{ mL}$$

=> Selanjutnya dibuat deret konsentrasi 10, 20, 40, 80 dan 160 ppm.



Gambar aktivitas antioksidan fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 1 : 1

- Fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 2 : 1

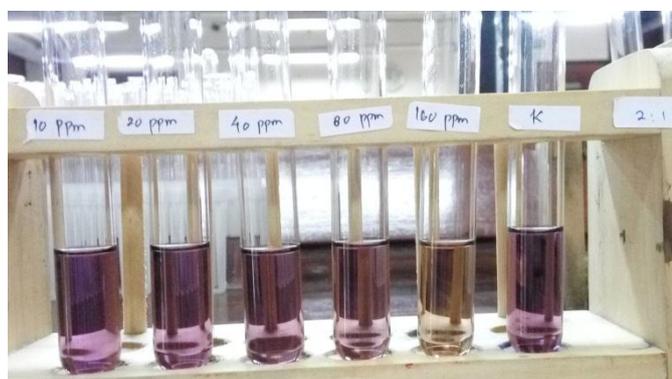
$$= 0,006 \text{ gr} + 0,003 \text{ gr}$$

$$= 0,009 \text{ gr} = 9 \text{ mg} \Rightarrow 500 \text{ ppm}$$

$$\text{Ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$500 = \frac{9 \text{ mg}}{\text{L}}, \quad \text{L} = \frac{9 \text{ mg}}{500} = 0,018 \text{ L} = 18 \text{ mL}$$

=> Selanjutnya dibuat deret konsentrasi 10, 20, 40, 80 dan 160 ppm.



Gambar aktivitas antioksidan fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 2 : 1

- Fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 3 : 1

$$= 0,009 \text{ gr} + 0,003 \text{ gr}$$

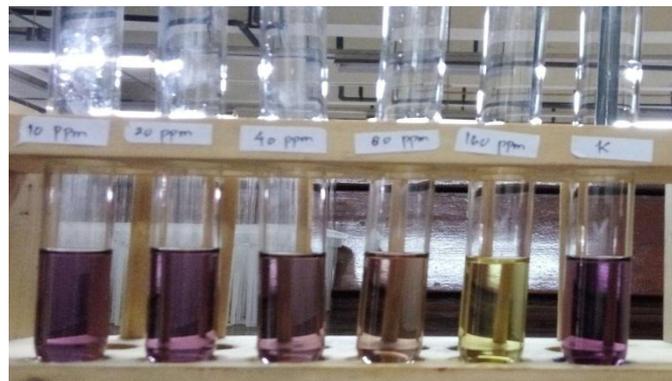
$$= 0,018 \text{ gr} = 18 \text{ mg}$$

$$\text{Ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$500 = \frac{12 \text{ mg}}{\text{L}}$$

$$\text{L} = \frac{12 \text{ mg}}{500} = 0,024 \text{ L} = 24 \text{ mL}$$

=> Selanjutnya dibuat deret konsentrasi 10, 20, 40, 80 dan 160 ppm.



Gambar aktivitas antioksidan fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 3 : 1

- Fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 1 : 2

$$= 0,003 \text{ gr} + 0,006 \text{ gr}$$

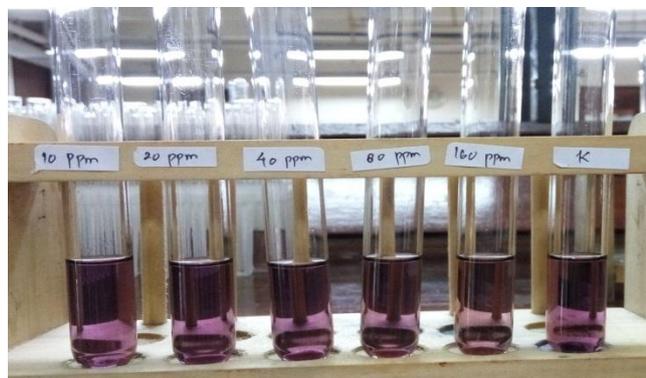
$$= 0,009 \text{ gr} = 9 \text{ mg} \Rightarrow 500 \text{ ppm}$$

$$\text{Ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$500 = \frac{9 \text{ mg}}{\text{L}}$$

$$= \frac{9 \text{ mg}}{500} = 0,018 \text{ L} = 18 \text{ mL}$$

=> Selanjutnya dibuat deret konsentrasi 10, 20, 40, 80 dan 160 ppm.



Gambar aktivitas antioksidan fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 1 : 2

- Fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 1 : 3

$$= 0,003 \text{ gr} + 0,009 \text{ gr}$$

$$= 0,012 \text{ gr} = 12 \text{ mg} \Rightarrow 500 \text{ ppm}$$

$$\text{Ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$500 = \frac{12 \text{ mg}}{\text{L}}$$

$$= \frac{12 \text{ mg}}{500} = 0,024 \text{ L} = 24 \text{ mL}$$

=> Selanjutnya dibuat deret konsentrasi 10, 20, 40, 80 dan 160 ppm.



Gambar aktivitas antioksidan fortifikasi ekstrak *A. muricata* L. dan nanokitosan 1 : 3

## Aktifitas Antioksidan

### 1. Ekstrak Daun *A. muricata* L.

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi (A) $\lambda = 517 \text{ nm}$			Absorbansi rata-rata	Aktivitas Antioksidan (%)
	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3		
10	0.63	0.633	0.635	0.63	9.62
20	0.618	0.62	0.618	0.62	11.62
40	0.55	0.552	0.554	0.55	21.14
80	0.408	0.408	0.41	0.41	41.62
160	0.34	0.342	0.342	0.34	51.24
Kontrol	0.696	0.696	0.698	0.70	0.48

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas Antioksidan (%)	Nilai $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
10	9.62	
20	11.62	
40	21.14	141.127
80	41.62	
160	51.24	

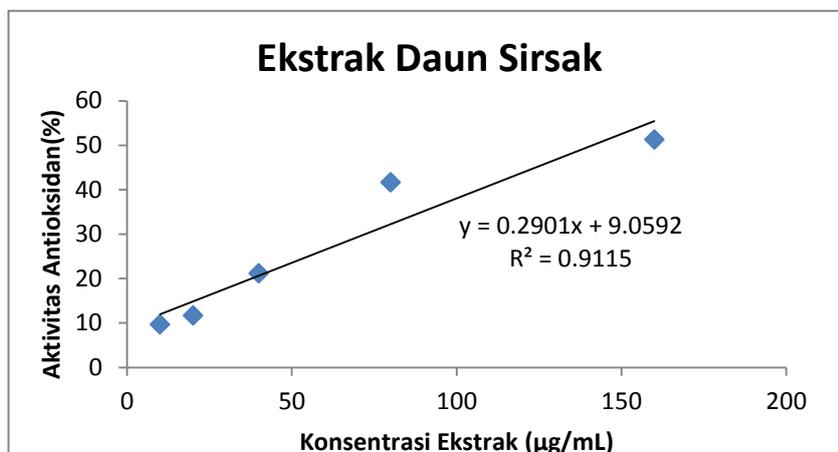
nilai  $\text{IC}_{50}$

$x = \text{IC}_{50}$

$y = 50$

$y = 0,2901x + 9,0592$

$\text{IC}_{50} (X) = (y - 9,0592) / 0,2901 = (50 - 9,0592) / 0,2901 = 141,127 \mu\text{g/mL}$

Gambar aktivitas antioksidan *A. muricata* L.

## 2. Nanokitosan

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi (A) $\lambda = 517 \text{ nm}$			Absorbansi rata-rata	Aktivitas Antioksidan (%)
	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3		
500	0.62	0.62	0.62	0.62	10.14
1000	0.594	0.594	0.596	0.59	13.82
2000	0.516	0.516	0.516	0.52	25.22
4000	0.422	0.42	0.418	0.42	39.13
8000	0.398	0.4	0.4	0.40	42.13
Control	0.69	0.688	0.69	0.69	0.10

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas Antioksidan (%)	Nilai $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
500	10.14	8633.023
1000	13.82	
2000	25.22	
4000	39.13	
8000	42.13	

---

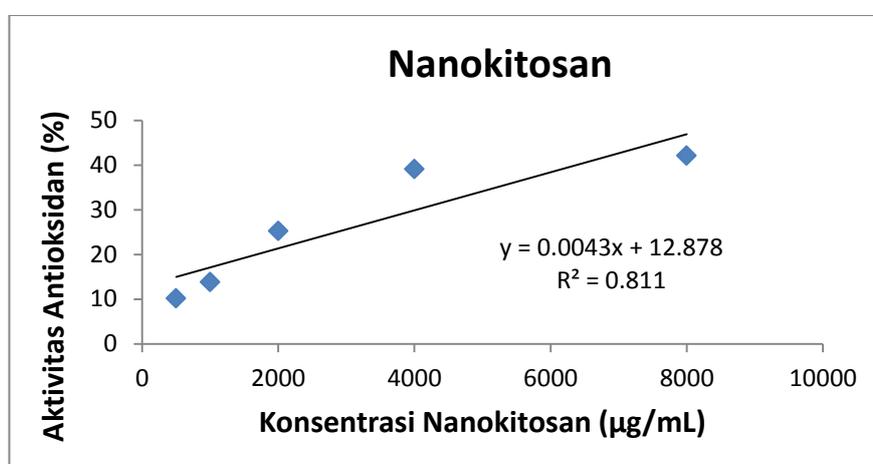
nilai  $IC_{50}$

$$x = IC_{50}$$

$$y = 50$$

$$y = 0,0043x + 12,878$$

$$IC_{50} (X) = (y - 12,878) / 0,0043 = (50 - 12,878) / 0,0043 = 8633,023 \mu\text{g/mL}$$



Gambar aktivitas antioksidan nanokitosan

### 3. Fortifikasi Ekstrak *A. muricata* L. dan Nanokitosan

- Fortifikasi Ekstrak *A. muricata* L. dan Nanokitosan 1:1

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi (A) $\lambda = 517 \text{ nm}$			Absorbansi rata-rata	Aktivitas Antioksidan (%)
	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3		
10	0.6	0.6	0.6	0.60	5.66
20	0.596	0.595	0.595	0.60	6.39
40	0.568	0.57	0.57	0.57	10.48
80	0.512	0.51	0.512	0.51	19.60
160	0.424	0.425	0.425	0.42	33.23
Kontrol	0.636	0.636	0.636	0.64	0.00
Blanko	0.168	0.168	0.168	0.17	73.58

---

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas Antioksidan (%)	Nilai $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
10	5.66	
20	6.39	
40	10.48	246.496
80	19.60	
160	33.23	

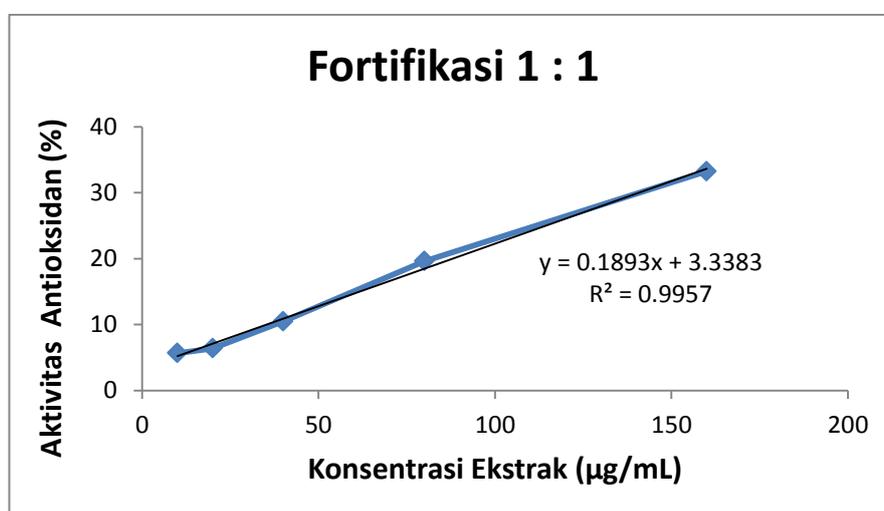
nilai  $\text{IC}_{50}$

$$x = \text{IC}_{50}$$

$$y = 50$$

$$y = 0,1893x + 3,3383$$

$$\text{IC}_{50} (X) = (y - 3,3383)/0,1893 = (50 - 3,3383)/0,1893 = 246,496 \mu\text{g/mL}$$



Gambar aktivitas antioksidan fortifikasi daun sirsak & nanokitosan (1:1)

- Fortifikasi Ekstrak *A. muricata* L. dan Nanokitosan 2 :1

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi (A) $\lambda = 517 \text{ nm}$			Absorbansi rata-rata	Aktivitas Antioksidan (%)
	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3		
10	0.603	0.603	0.603	0.60	5.93
20	0.585	0.585	0.585	0.59	8.74
40	0.581	0.582	0.582	0.58	9.26
80	0.517	0.518	0.518	0.52	19.24
160	0.417	0.417	0.42	0.42	34.79
Kontrol	0.641	0.641	0.641	0.64	0.00
Blanko	0.167	0.167	0.167	0.17	73.95

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas Antioksidan (%)	Nilai $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
10	5.93	
20	8.74	
40	9.26	240.009
80	19.24	
160	34.79	

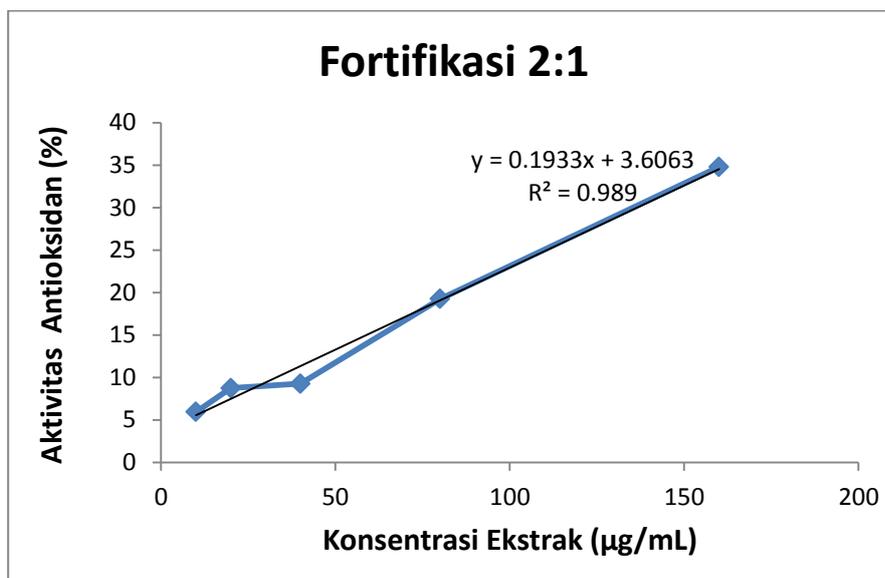
nilai  $\text{IC}_{50}$

$x = \text{IC}_{50}$

$y = 50$

$y = 0,1933x + 3,6063$

$\text{IC}_{50} (X) = (y-3,6063)/0,1933 = (50-3,6063)/0,1933 = 240,009 \mu\text{g/mL}$



Gambar aktivitas antioksidan fortifikasi daun sirsak & nanokitosan (2:1)

- Fortifikasi Ekstrak *A. muricata* L. dan Nanokitosan 3 :1

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi (A) $\lambda = 517$ nm			Absorbansi rata-rata	Aktivitas Antioksidan (%)
	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3		
10	0.585	0.585	0.585	0.59	7.29
20	0.559	0.56	0.56	0.56	11.30
40	0.511	0.51	0.51	0.51	19.12
80	0.399	0.4	0.402	0.40	36.56
160	0.267	0.267	0.267	0.27	57.69
Kontrol	0.631	0.631	0.631	0.63	0.00
Blanko	0.165	0.165	0.165	0.17	73.85

Konsentrasi (µg/mL)	Aktivitas Antioksidan (%)	Nilai IC-50 (µg/mL)
10	7.29	
20	11.30	
40	19.12	131.749
80	36.56	
160	57.69	

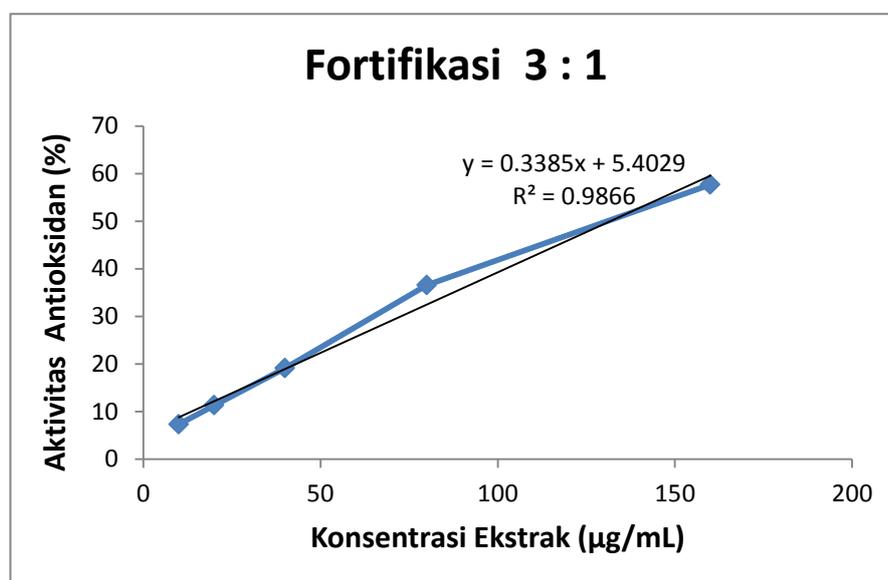
nilai IC<sub>50</sub>

$x = IC_{50}$

$y = 50$

$y = 0,3385x + 5,4029$

$IC_{50} (X) = (y-5,4029)/0,3385 = (50-5,4029)/0,3385 = 131,749 \mu\text{g/mL}$



Gambar aktivitas antioksidan fortifikasi daun sirsak & nanokitosan (3:1)

- Fortifikasi Ekstrak *A. muricata* L. dan Nanokitosan 1 : 2

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi (A) $\lambda = 517 \text{ nm}$			Absorbansi rata-rata	Aktivitas Antioksidan (%)
	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3		
10	0.62	0.62	0.621	0.62	2.77
20	0.606	0.605	0.605	0.61	5.12
40	0.592	0.591	0.591	0.59	7.31
80	0.56	0.56	0.56	0.56	12.23
160	0.476	0.477	0.476	0.48	25.34
Kontrol	0.638	0.638	0.638	0.64	0.00
Blanko	0.166	0.166	0.166	0.17	73.98

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas	
	Antioksidan (%)	Nilai $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
10	2.77	
20	5.12	
40	7.31	330.908
80	12.23	
160	25.34	

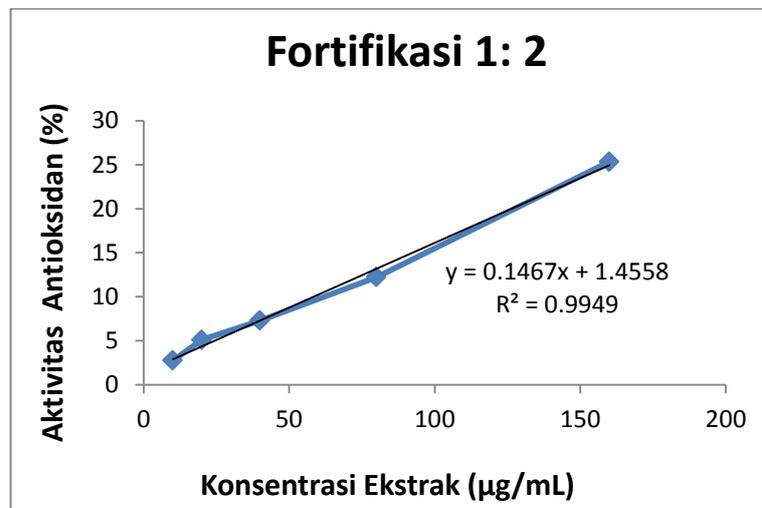
nilai  $\text{IC}_{50}$

$$x = \text{IC}_{50}$$

$$y = 50$$

$$y = 0,1467x + 1,4558$$

$$\text{IC}_{50} (X) = (y-1,4558)/0,1467 = (50-1,4558)/0,1467 = 330,908 \mu\text{g/mL}$$



Gambar aktivitas antioksidan fortifikasi daun sirsak & nanokitosan (1:2)

- Fortifikasi Ekstrak *A. muricata* L. dan Nanokitosan 1 : 3

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi (A) $\lambda = 517$ nm			Absorbansi rata-rata	Aktivitas Antioksidan (%)
	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3		
10	0.613	0.61	0.613	0.61	5.41
20	0.611	0.609	0.611	0.61	5.67
40	0.609	0.606	0.609	0.61	6.03
80	0.573	0.57	0.57	0.57	11.75
160	0.531	0.531	0.53	0.53	17.98
Kontrol	0.647	0.647	0.647	0.65	0.00
Blanko	0.165	0.165	0.165	0.17	74.50

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas Antioksidan (%)	Nilai $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
10	5.41	
20	5.67	
40	6.03	519.571
80	11.75	
160	17.98	

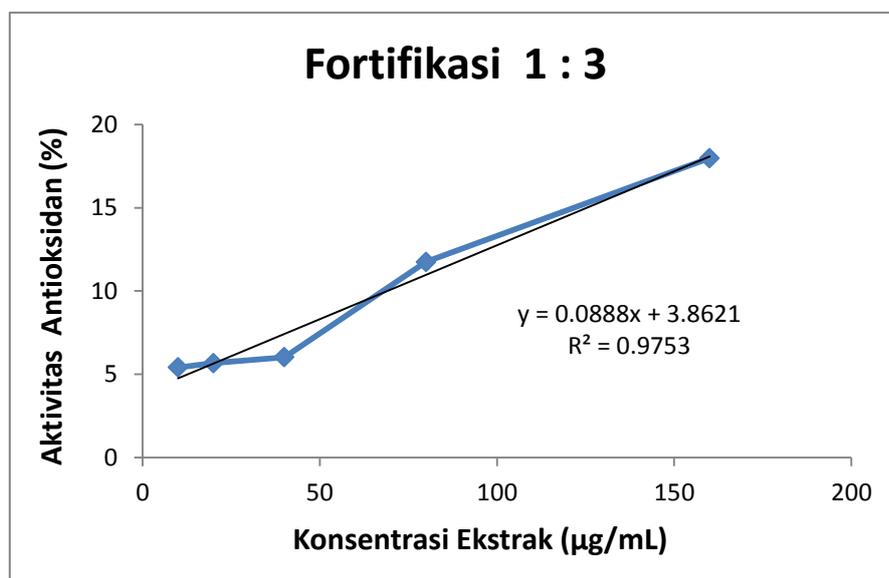
nilai  $\text{IC}_{50}$

$x = \text{IC}_{50}$

$y = 50$

$y = 0,0888x + 3,8621$

$\text{IC}_{50} (X) = (y-3,8621)/0,0888 = (50-3,8621)/0,0888 = 519,571 \mu\text{g/mL}$



Gambar aktivitas antioksidan fortifikasi daun sirsak & nanokitosan (1:3)

## 4. Antioksidan pada Kontrol Positif (Asam Askorbat)

No	Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi (A) λ = 515 nm	Aktivitas Antioksidan (%)
1	0.25	0.304	27.10
2	0.5	0.289	30.70
3	1	0.27	35.25
4	2	0.239	42.69
5	4	0.15	64.03
6	Kontrol	0.417	

No	Konsentrasi (µg/mL)	Aktivitas Antioksidan (%)	Nilai IC <sub>50</sub> (µg/mL)
1	0.25	27.10	
2	0.5	30.70	
3	1	35.25	2.597
4	2	42.69	
5	4	64.03	

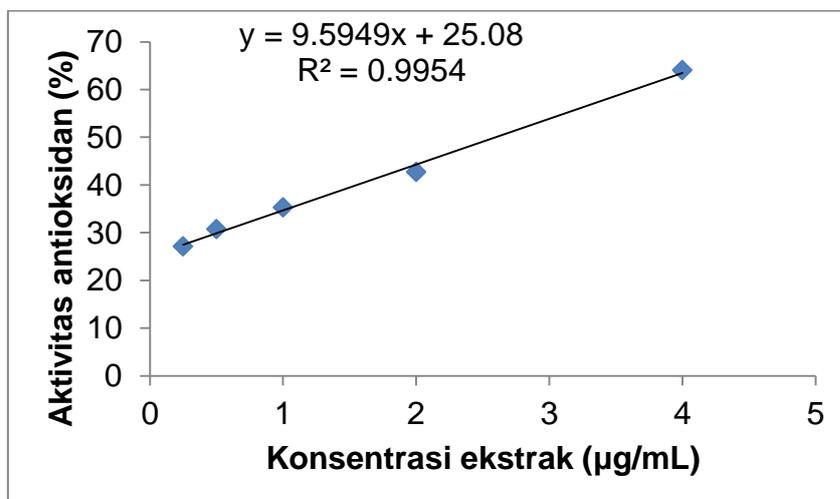
nilai  
IC<sub>50</sub>

x = IC

50            y = 50

y = 9.594x + 25.08

IC<sub>50</sub> (X) = (y-25.08/9.594= (50-25.08)/9.594=  
2.597 µg/mL



Gambar aktivitas antioksidan pada asam askorbat

**Lampiran 11.** Foto proses ekstraksi daun *A. muricata* L.Proses pengeringan sampel daun *A. muricata* L.Proses pemotongan, pengeringan dengan oven dan penghalusan sampel daun *A. muricata* L.Proses penyaringan, penimbangan dan pelarutan sampel daun *A. muricata* L. dengan etanol 96%



Proses pelarutan dalam botol vial, ekstraksi dengan sonikator dan penyaringan dengan buchner sampel daun *A. muricata* L.



Proses evaporasi dan perolehan ekstrak etanol daun *A. muricata* L.

**Lampiran 12.** Karakteristik kitosan

**LABORATORIUM BIOKIMIA**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

Kampus UNHAS Tamalanrea, Jl. Perintis Kemerdekaan KM. 10, Makassar 90245

Telp/Fax : 0411-586498

**HASIL ANALISIS**

Nama/NIM : Ita Hasmila /H012 17 1 009  
 Asal Institusi : Fakultas MIPA UNHAS  
 Jenis Sampel : Kitosan Pharma  
 Jumlah : Satu  
 Analisis : Kadar Air  
                   Kadar Abu  
                   Nitrogen total

No.	Kode	Kadar air (%)	Kadar Abu (%)	N total (%)
1	Kitosan Niaga	10.40	1.13	7.10

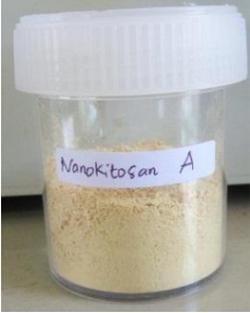
Makassar, 15 April 2019

PLP Lab. Biokimia

Mahdalia, S.Si, M.Si

NIP. 19750826 199601 2 001

**Lampiran 13. Sintesis dan karakterisasi nanokitosan**

		
<p>Kitosan dari cangkang kepiting merah <i>Pharma grade</i></p>		
		
<p>Proses Sintesis nanokitosan dengan melarutkan kitosan+ asam asetat dan penambahan Na-TPP dan tween 80</p>		
		
<p>Nanokitosan dalam bentuk larutan, proses spray dryer dan serbuk nanokitosan yang diperoleh</p>		