



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS α -GLUKOSIDASE
EKSTRAK DAN FRAKSI DARI EKSTRAK ETIL ASETAT
BUAH KETAPANG (*Terminalia catappa* L.) SERTA
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI
FRAKSI TERAKTIF**

SKRIPSI

**DEVIN AYU PUTRI DEWA
0806327736**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS α -GLUKOSIDASE
EKSTRAK DAN FRAKSI DARI EKSTRAK ETIL ASETAT
BUAH KETAPANG (*Terminalia catappa* L.) SERTA
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI
FRAKSI TERAKTIF**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi

**DEVIN AYU PUTRI DEWA
0806327736**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**

ii

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 25 Juni 2012

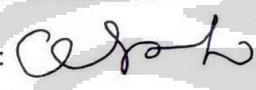


Devin Ayu Putri Dewa

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.



Nama : Devin Ayu Putri Dewa
NPM : 0806327736
Tanda Tangan : 
Tanggal : 9 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Devin Ayu Putri Dewa
NPM : 0806327736
Program Studi : Sarjana Farmasi
Judul Skripsi : Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Ekstrak dan Fraksi dari Ekstrak Etil Asetat Buah Ketapang (*Terminalia catappa* L.) serta Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

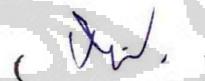
Pembimbing I : Dr. Katrin, M.S., Apt



Pembimbing II : Dra. Azizahwati, M.S., Apt



Penguji I : Dr. Hayun, M.Si.



Penguji II : Dr. Berna Elya, Apt, M.Si



Ditetapkan di : Depok

Tanggal :

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya ucapkan ke hadapan Allah SWT karena atas limpahan rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Penulis menyadari, sangat sulit menyelesaikan skripsi ini tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Ibu Dr. Katrin, M.S selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
- (2) Ibu Dra. Azizahwati, M.S., Apt selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
- (3) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
- (4) Bapak Prof. Drs. Maksun Radji, M. Biomed selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;
- (5) Bapak Dr. Abdul Mun'im, MS selaku kepala proyek dan evaluator praseminar yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
- (6) Bapak dan Ibu staf pengajar, karyawan dan laboran Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;
- (7) Orang tua (Alm. Susetyo Sadewo dan Alm. Noviyanti Indarwati), adik (Ovina dan Billa), nenek Wati, tante Leny, dan Donny yang senantiasa memberikan dukungan dan doa demi kelancaran studi penulis;

- (8) Teman-teman baik penulis, Samira, Selly, Tika, Zhuisa, Charla, Santi, Nurul yang telah banyak membantu penulis selama masa perkuliahan;
- (9) Teman-teman selama di laboratorium fitokimia, mba Ulfa dan mas Agus yang telah menjadi keluarga baru selama semester akhir ini;
- (10) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

Akhir kata penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis

2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Devin Ayu Putri Dewa
NPM : 0806327736
Program Studi : Sarjana
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Ekstrak dan Fraksi dari Ekstrak Etil Asetat Buah Ketapang (*Terminalia catappa* L.) serta Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 25 Juni 2012
Yang menyatakan



(Devin Ayu Putri Dewa)

ABSTRAK

Nama : Devin Ayu Putri Dewa
Program Studi : S1 Farmasi
Judul : Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Ekstrak dan Fraksi dari Ekstrak Etil Asetat Buah Ketapang (*Terminalia catappa* L.) serta Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif

Diabetes melitus terdiri dari sejumlah gangguan yang dikarakterisasi oleh hiperglikemia, perubahan metabolisme lipid, karbohidrat dan protein serta peningkatan risiko komplikasi akibat penyakit vaskuler. Salah satu obat antidiabetes oral yang digunakan dalam mengobati diabetes melitus adalah penghambat aktivitas α -glukosidase. Pada penelitian terdahulu dilaporkan bahwa ekstrak etil asetat buah ketapang (*Terminalia catappa* L.) memiliki penghambatan aktivitas α -glukosidase tertinggi bila dibandingkan dengan ekstrak lain. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh fraksi yang memiliki penghambatan aktivitas α -glukosidase paling baik dari ekstrak teraktif buah ketapang (*Terminalia catappa* L.) dan mengetahui golongan senyawa kimia dari fraksi tersebut. Ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi bertingkat secara refluks menggunakan n-heksana, etil asetat dan metanol. Metode yang digunakan adalah *spectrophotometric stop rate determination* dengan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida menggunakan *microplate reader*. Absorbansi p-nitrofenol yang dihasilkan, diukur pada panjang gelombang 405 nm. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat buah ketapang memiliki penghambatan paling kuat terhadap aktivitas α -glukosidase dengan nilai IC_{50} 57,974 ppm. Ekstrak etil asetat kemudian difraksinasi dengan kromatografi kolom dan diperoleh 14 fraksi gabungan. Fraksi G merupakan fraksi teraktif yang memiliki nilai IC_{50} 44,243 ppm dan mempunyai aktivitas penghambatan kompetitif. Dari hasil penapisan fitokimia diperoleh bahwa fraksi teraktif mengandung flavonoid, terpen dan glikon.

Kata Kunci : flavonoid, diabetes melitus, glikon, penghambat α -glukosidase, *Terminalia catappa* L., terpen
xvi + 94 halaman : 34 gambar; 21 tabel; 19 lampiran
Daftar Acuan : 50 (1966-2011)

ABSTRACT

Name : Devin Ayu Putri Dewa
Program study : S1 Pharmacy
Title : Inhibitory Test Activity of α -Glucosidase from Extract and Ethyl Acetate Extract Fraction of Indian Almond Fruit (*Terminalia catappa* L.) and Phytochemical Compounds Identification from The Active Fraction

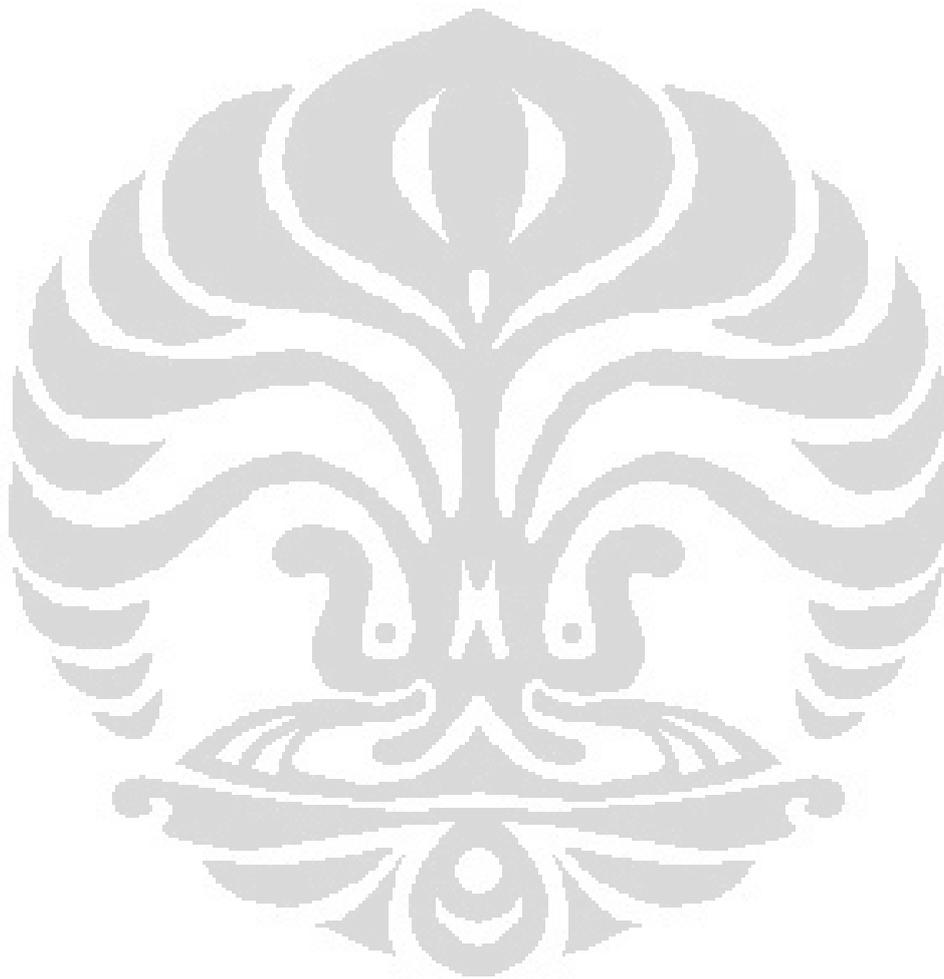
Diabetes mellitus consists of some disorders which was characterized by hyperglycemia, change in lipid, carbohydrate, protein metabolism and also increase the complication caused by vascular risk. One of pharmacologic therapy which is used in treating diabetes mellitus is α -glucosidase inhibitor. The previous study reported that ethyl acetate extract of Ketapang (*Terminalia catappa* L.) fruits have the highest α -glucosidase inhibitory activity compare to other extract. The purpose of this research is to get the fraction which had the highest α -glucosidase inhibitory activity from Ketapang fruits extract and to know the phytochemical compounds from the most active fraction. Extraction was processed by graduated-reflux used n-hexane, ethyl acetate and methanol. The inhibitory activity of α -glucosidase was assayed by spectrophotometric stop rate determination with p-nitrophenil- α -D-glukopiranosida as substrate used microplate reader. The absorbance of p-nitrophenol was measured at 405 nm. The result showed that ethyl acetate extract of Ketapang fruits have the highest α -glucosidase inhibitory activity which value of IC_{50} is 57,974 ppm. Ethyl acetate extract was fractionated by coloumn chromatography and 14 combine fractions was gotten. G fraction was the most active fraction which value of IC_{50} is 44,243 ppm and has a competitive inhibitory activity. Phytochemical identification showed that G fraction contained flavonoids, terpenoids and glycons.

Key Words : flavonoids, diabetes mellitus, glycons, α -glucosidase inhibitor, *Terminalia catappa* L., terpenoids
xvi + 94 pages : 34 pictures; 21 tables; 19 appendices
Bibliography : 50 (1966-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
1.3 Manfaat Penelitian	2
2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 <i>Terminalia catappa</i> L. (Ketapang)	3
2.2 Diabetes Melitus	7
2.3 Enzim	12
2.4 Teknik Pemisahan	20
2.5 <i>Microplate Reader</i>	24
2.6 Penapisan Fitokimia	25
3. METODE PENELITIAN	28
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	28
3.2 Bahan	28
3.3 Alat	29
3.4 Prosedur Pelaksanaan	29
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	45
4.1 Penyiapan Bahan Uji	45
4.2 Ekstaksi Simplisia	46
4.3 Fraksinasi	47
4.4 Uji Pendahuluan Aktivitas α -Glukosidase	48
4.5 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase	51
4.6 Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase	54
4.7 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi Teraktif	56

5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	60
5.1 Kesimpulan	60
5.2 Saran	60
DAFTAR ACUAN	61



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Terminalia catappa</i> L	4
Gambar 2.2 Perbedaan struktur penghambatan kompetitif dan nonkompetitif	14
Gambar 2.3 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi enzimatis	14
Gambar 2.4 Plot hubungan $1/v_i$ terhadap $1/K_m$	16
Gambar 2.5 Plot Lineweaver-Burk untuk inhibisi kompetitif	17
Gambar 2.6 Plot Lineweaver-Burk untuk inhibisi nonkompetitif	17
Gambar 2.7 Struktur kimia akardiose	18
Gambar 2.8 Persamaan reaksi enzimatis α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida	20
Gambar 2.9 <i>Microplate Reader</i>	25
Gambar 3.1 <i>Rotary Vacuum Evaporator</i>	66
Gambar 3.2 Inkubator	66
Gambar 3.3 <i>Multichannel pipette</i>	66
Gambar 3.4 <i>Microplate</i>	66
Gambar 3.5 <i>Microplate reader</i>	66
Gambar 4.1 Buah ketapang	45
Gambar 4.2 Grafik Optimasi absorbansi dengan variasi konsentrasi substrat 0,0312; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 mM	50
Gambar 4.3 Plot Lineweaver-Burk fraksi etil asetat 50 ppm dengan konsentrasi substrat PNP-G 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 mM	56
Gambar 4.4 Pola kromatogram sampel	67
Gambar 4.5 Kromatogram alkaloid	67
Gambar 4.6 Kromatogram flavonoid	68
Gambar 4.7 Kromatogram terpenoid	68
Gambar 4.8 Kromatogram tanin	69
Gambar 4.9 Kromatogram saponin	69
Gambar 4.10 Kromatogram antrakuinon	70
Gambar 4.11 Identifikasi glikosida	70
Gambar 4.12 Identifikasi flavonoid	71
Gambar 4.13 Identifikasi terpenoid	71
Gambar 4.14 Identifikasi saponin	72

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Prosedur optimasi konsentrasi substrat.....	33
Tabel 3.2	Prosedur uji penghambatan aktivitas α -glukosidase.....	37
Tabel 3.3	Prosedur penentuan kinetika penghambatan enzim.....	40
Tabel 4.1	Persentase perbandingan berat buah ketapang kering terhadap berat buah ketapang segar	73
Tabel 4.2	Rendemen ekstrak buah ketapang	73
Tabel 4.3	Rendemen fraksi hasil fraksinasi dengan kromatografi kolom	74
Tabel 4.4	Optimasi aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat ,0312; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 mM	75
Tabel 4.5	Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada akardose (blanko)	75
Tabel 4.6	Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak n-heksana	76
Tabel 4.7	Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak etil asetat	76
Tabel 4.8	Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak metanol.....	77
Tabel 4.9	Hasil uji penghambatan aktivitas α -glukosidase ekstrak	52
Tabel 4.10	Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi D.....	77
Tabel 4.11	Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi G.....	78
Tabel 4.12	Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi H.....	78
Tabel 4.13	Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi L.....	79
Tabel 4.14	Hasil uji penghambatan aktivitas α -glukosidase fraksi.....	53
Tabel 4.15	Hasil uji kinetika penghambatan aktivitas enzim fraksi teraktif	80
Tabel 4.16	Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten fraksi G dengan konsentrasi 50 ppm	80
Tabel 4.17	Hasil Identifikasi Golongan Senyawa.....	59

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Determinasi Buah Ketapang	81
Lampiran 2. Skema Ekstraksi Bertingkat Buah Ketapang	82
Lampiran 3. Fraksinasi Ekstrak Etil Asetat dan Identifikasi Golongan Senyawa yang Memiliki Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase.....	83
Lampiran 4. Sertifikat Analisis α -Glukosidase.....	84
Lampiran 5. Cara Perhitungan Bobot α -Glukosidase yang Ditimbang.....	85
Lampiran 6. Sertifikat Analisis Substrat p-Nitrofenil- α -D-glukopiranosida.....	86
Lampiran 7. Spektrum serapan p-nitrofenol pada panjang gelombang 400 nm	87
Lampiran 8. Perhitungan Aktivitas Enzim pada Berbagai Konsentrasi Substrat.....	88
Lampiran 9. Skema Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase.....	89
Lampiran 10. Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} Akarbose	90
Lampiran 11. Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} Ekstrak n-Heksana.....	91
Lampiran 12. Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} Ekstrak Etil Asetat.....	92
Lampiran 13. Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} Ekstrak Metanol	93
Lampiran 14. Plot Hubungan Konsentrasi dan Persen Inhibisi Akarbose dan tiap Ekstrak	94
Lampiran 15. Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} Fraksi D.....	96
Lampiran 16. Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} Fraksi G.....	97
Lampiran 17. Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} Fraksi H.....	98
Lampiran 18. Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} Fraksi L.....	99
Lampiran 19. Plot Hubungan Konsentrasi dan Persen Inhibisi tiap Fraksi.....	100
Lampiran 20. Perhitungan Kinetika Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Fraksi Terajtif (fraksi G).....	102

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) merupakan sejumlah gangguan yang ditandai oleh adanya hiperglikemia, perubahan metabolisme lipid, karbohidrat dan protein, serta dapat menyebabkan terjadi peningkatan resiko komplikasi akibat penyakit vaskular. Secara umum, pasien diabetes diklasifikasikan menjadi pasien DM tipe 1 atau tipe 2 (Brunton, Parker, Blumenthal, & Buxton, 2008). DM tipe 2 menjadi salah satu masalah kesehatan yang terus meningkat di dunia, khususnya negara berkembang (Beaglehole & Yach, 2003). Indonesia merupakan negara dengan peringkat ke-4 (di bawah India, Cina, dan USA) yang memiliki prevalensi kasus diabetes terbesar di dunia. Kasus diabetes di Indonesia pada tahun 2000 sebanyak 8,4 juta dan diperkirakan meningkat menjadi 21,3 juta pada tahun 2030 (Wild, et al., 2004).

Salah satu langkah pertama dalam pengobatan DM tipe 2 adalah diet dan olahraga, tetapi apabila kadar gula darah tetap tidak dapat dikendalikan, maka terapi dapat dilanjutkan dengan obat. Penghambat α -glukosidase merupakan antidiabetes oral dimana target spesifiknya adalah hiperglikemia postprandial dan mampu menurunkan faktor resiko terjadinya komplikasi kardiovaskular (Brunton, Parker, Blumenthal, & Buxton, 2008). Penghambat α -glukosidase seperti akarbose, voglibose dan miglitol dapat dikombinasikan dengan medikasi antidiabetik yang lain (Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2007).

Beberapa penghambat α -glukosidase telah diisolasi dari tanaman untuk dikembangkan sebagai alternatif pengobatan dengan potensi yang tinggi (Shihabudeen, Pricilla, & Thirumurugan, 2011). Ekstrak petroleum eter, metanol dan air dari buah *Terminalia catappa* L. menghasilkan aktivitas antidiabetes yang signifikan pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan dengan dosis seperlima dari dosis letalnya (Nagappa, Thakurdesai, Raob, & Singh, 2003). Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak air dari daun *Terminalia catappa* L. juga menghasilkan aktivitas antidiabetes yang serupa (Ahmed, BM, Dhanapal, & Chandrashekara, 2005).

Berdasarkan penelitian *in vitro* terdahulu diketahui bahwa ekstrak etanol 80% dari buah *Terminalia catappa* L. memiliki aktivitas penghambat α -glukosidase dengan nilai IC_{50} 3,02 ppm (Fitriana, 2011), dimana fraksi etil asetat dari *Terminalia catappa* L. memiliki aktivitas penghambatan α -glukosidase tertinggi dibandingkan ketiga fraksi lainnya, yaitu petroleum eter, butanol dan metanol, dengan mekanisme penghambatan kompetitif terhadap α -glukosidase (Sofawati, 2011).

Pada penelitian ini dilakukan uji penghambatan terhadap aktivitas α -glukosidase dari ekstrak etil asetat dan fraksi hasil kromatografi kolom. Fraksinasi dengan kromatografi kolom perlu dilakukan untuk memisahkan banyak senyawa yang terkandung dalam ekstrak sehingga diharapkan salah satu senyawa tersebut memiliki efek penghambatan terhadap aktivitas α -glukosidase. Ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi bertingkat secara refluks menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol secara berturut-turut dengan kepolaran yang semakin meningkat. Ekstrak etil asetat yang diperoleh difraksinasi dan dilakukan uji penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak dan tiap fraksi yang telah digabung. Fraksi yang paling aktif dilakukan penapisan fitokimia untuk mengidentifikasi komponen dalam fraksi.

1.2 Tujuan Penelitian

- a. Memperoleh fraksi yang memiliki penghambatan aktivitas α -glukosidase paling baik dari ekstrak teraktif buah ketapang (*Terminalia catappa* L.).
- b. Mengetahui golongan senyawa yang terkandung pada fraksi teraktif buah ketapang.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi ilmiah dari tanaman ketapang (*Terminalia catappa* L.) sehingga dapat dijadikan rujukan pada penelitian selanjutnya dan dapat meningkatkan penggunaannya sebagai salah satu pengobatan dalam terapi diabetes melitus.

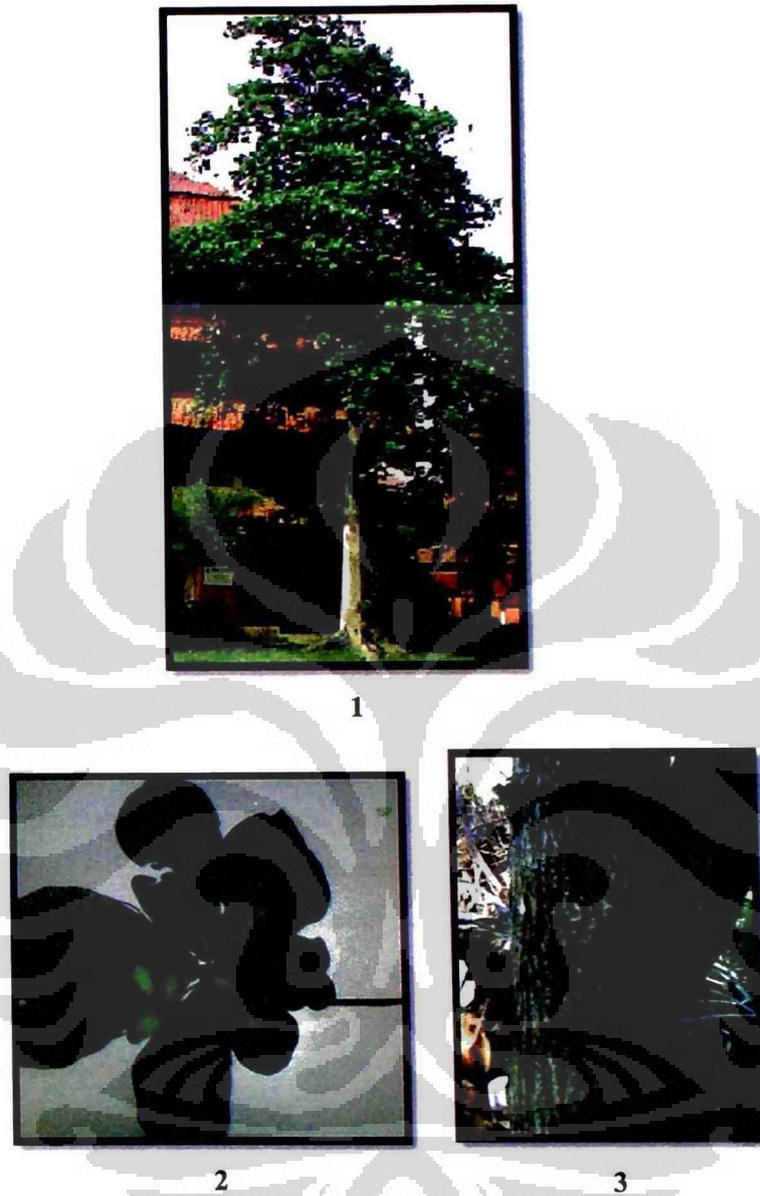
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Terminalia catappa* L. (Ketapang)

2.1.1 Klasifikasi (Lemmens & Soetjipto, 1992; Heyne, 1987; Jones & Luchsinger, 1987)

Kerajaan : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Bangsa : Myrtales
Suku : Combretaceae
Marga : *Terminalia*
Jenis : *Terminalia catappa* L.
Sinonim : *Terminalia moluccana* Lamk
Terminalia procera Roxb.
Terminalia latifolia Blanco, non Swartz

Nama daerah: Beowa, kilaulu, geutapang, ketapang, hatapang, katapang, lahapang, katafa, ketapas ketapieng (Sumatera); katapang, ketapang (Jawa); katapang, klihi (Nusatenggara); tarisel, salrisetalisei, talise, kanaungang, katapang, atapang,lisa (Sulawesi); wewa, wew, sadina, sarina,saliha, sertalo, kayane, sirisa, sarisa, sirisal, sarisalo, lisa, tasi, klis, klais, kris, ngusu, id (Maluku); ruge (Irian) (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989).



[Sumber: Dokumentasi Pribadi]

Keterangan: (1) Tanaman Ketapang; (2) Daun dan Buah Ketapang; (3) Batang Ketapang.

Gambar 2.1 *Terminalia catappa* L.

2.1.2 Morfologi

Tumbuhan berupa pohon besar dengan tinggi hingga 20 m dan diameter batangnya 1-1,5 m, kayunya agak keras berwarna merah atau kuning. Kulit kayu berwarna abu-abu kecoklatan, cabangnya tersusun bertingkat dengan jarak 1-2 meter tiap cabang, panjang dan horizontal. Daun berselang-seling tersebar di ujung ranting, serupa kulit, licin di bagian atas dan berambut halus di bagian bawah. Bunga berukuran sangat kecil, berwarna hijau kekuningan dan terkumpul dalam bulir dekat ujung ranting. Buah berbentuk telur pipih, keras, berwarna hijau atau kuning atau berwarna merah jika buah sudah masak (Lemmens & Wulijarni-Soetjipto, 1992). Morfologi dari ketapang ditunjukkan oleh Gambar 2.1.

2.1.3 Ekologi dan Budidaya

Ketapang tumbuh liar di dataran rendah Nusantara, di Jawa hanya ditemui di daerah/pantai atau dekat pesisir, ditanam pada daerah dengan ketinggian lebih kurang 800 m di atas permukaan laut (Heyne, 1987). Ketapang merupakan tanaman asli Asia Tenggara, dimana tanaman tersebut banyak tersebar di daerah tersebut, khususnya Sumatera dan Borneo. Ketapang juga ditemui di Australia bagian utara, Polinesia seperti Pakistan, India, Afrika bagian barat dan timur, Madagaskar dan beberapa kepulauan di Amerika selatan dan pusat (Lemmens & Soetjipto, 1992).

2.1.4 Kandungan Kimia

Kandungan kimia dari tanaman ketapang yaitu tanin (puni-kalagin, punikalin, terflavin A dan B, tergalin, ter-katain, asam sebulagat, geranin, granatin B, korilagin), flavonoid (isoviteksin, viteksin, isoorientin, rutin) dan triterpenoid (asam ursolat, 2α , 3β , *23-trihydroxyurs-12-en-28 oic acid*) (Ahmed, BM, Dhanapal, & Chandrashekara, 2005). Selain itu, diketahui kandungan fitokimia dan kimia yang terdeteksi dari dekok ketapang, yaitu tanin, flavonoid, saponin, β -karoten, tiosianat, glikosida jantung, alkaloid, glikosida sanogenik, vitamin C, p-asam hidroksibenzoat (p-BHA), alkaloid, katekin, asam amino bebas dan monosakarida (Ibegbulem, C. O., Eyong, E. U. & Essien, E. U., 2011).

2.1.5 Kegunaan Tradisional

Ketapang merupakan tanaman yang multifungsi. Minyak yang terkandung di dalam ketapang dapat digunakan untuk mengobati inflamasi abdominal, dan bersamaan dengan daun dapat digunakan untuk pengobatan lepra, skabies, dan penyakit lain. Daun digunakan untuk pengobatan rematik. Tanin yang terdapat pada kulit kayu dan daun digunakan sebagai astringen pada disentri dan sariawan, juga sebagai diuretik, kardiotonik, dan pengobatan topikal dalam erupsi kulit (Lemmens, & Soetjipto, 1992). Akar dan kulit kayu ketapang dapat digunakan untuk mengobati radang selaput lendir usus dan disentri. Kayunya biasa digunakan dalam pembuatan perahu dan rumah. Kulit kayu sepat, banyak digunakan sebagai obat sariawan dan radang selaput lendir usus karena kaya akan damar. Kulit kayu dan daun digunakan untuk menyamak kulit, bahan baku cat dan tinta. Kulit kayu dapat digunakan sebagai penutup luka (Heyne, 1987). Biji ketapang dapat digunakan sebagai pencahar (laksantia) (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989).

2.1.6 Aktivitas Biologis

Beberapa uji aktivitas yang telah dilakukan pada tanaman *Terminalia catappa* L. yaitu:

2.1.6.1 Aktivitas antimikroba

Ekstrak metanol dari *Terminalia catappa* L. memiliki aktivitas antibakteri terhadap 10 jenis bakteri Gram positif, 12 jenis bakteri Gram negatif, dan satu strain jamur, *Candida tropicalis* (Nair & Chanda, 2008).

2.1.6.2 Aktivitas antioksidan

Ekstrak air dari daun *Terminalia catappa* L. memberikan aktivitas antioksidan, berupa penangkap dan kemampuan mengkelat radikal bebas. Ekstrak air dari tiga jenis daun yang berbeda warna menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi dan cukup memiliki kemampuan menangkap radikal hidroksil pada konsentrasi 1 mg/mL. Komponen fenol yang diidentifikasi dalam ekstrak adalah asam p-hidroksibenzoat, asam 4-hidroksifenilpropionat, asam m-kumarat, asam 3,4-dihidrobenzoat, asam-p-kumarat dan asam galat (Chyaua, Ko, & Mau, 2006).

Universitas Indonesia

2.1.6.3 Aktivitas analgesik

Ekstrak etanol daun *Terminalia catappa* L. dibuat dengan metode soxhlet. Efek analgesik dari ekstrak tersebut dilakukan dengan uji *formalin induced pain*, *hot plate* dan *tail flick*. Ekstrak *Terminalia catappa* L. (80 mg kg^{-1} , p.o.) menunjukkan peningkatan waktu reaksi yang signifikan ($p < 0,5$) pada uji *hot plate* dengan interval waktu 60, 90 dan 120 menit (Annegowda, Mordi, Ramanathan, & Mansor, 2010).

2.1.6.4 Aktivitas hepatoprotektif

Komponen asam ursolat dan asam asiatat yang diisolasi dari ekstrak kloroform daun *Terminalia catappa* L. memiliki aktivitas hepatoprotektif dan menangkal radikal bebas. Pada uji kerusakan hati, ketika diberikan karbon tetraklorida menunjukkan kenaikan aktivitas serum alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST), namun terjadi penurunan yang signifikan ketika dilakukan pengobatan dengan *Terminalia catappa* L. dengan dosis $50\text{-}100 \text{ mgkg}^{-1}$ (Gao, et al, 2004).

2.1.6.5 Aktivitas antidiabetes

Ekstrak air dari daun *Terminalia catappa* Linn (Combretacea) diteliti terhadap tikus diabetes yang diinduksi aloksan dan diukur level glukosa serum saat puasa dan analisis biokimia serum. Seluruh ekstrak dari *Terminalia catappa* menghasilkan aktivitas antidiabetes yang signifikan pada dosis seperlima dari dosis letal. Bersamaan dengan uji tersebut, pankreas dari hewan juga menunjukkan regenerasi akibat pemberian ekstrak air pada nekrosis yang terjadi karena aloksan (Ahmed, BM, Dhanapal, & Chandrashekar, 2005).

2.2 Diabetes Melitus

2.2.1 Definisi dan Klasifikasi

Diabetes melitus terdiri dari sejumlah gangguan yang dikarakterisasi oleh hiperglikemia, perubahan metabolisme lipid, karbohidrat dan protein serta dapat menyebabkan peningkatan risiko komplikasi akibat penyakit vaskuler (Brunton, Parker, Blumenthal, & Buxton, 2008). Pada pasien diabetes, ketidakmampuan

Universitas Indonesia

memetabolisme glukosa dengan baik disebabkan karena kekurangan hormon insulin. Dalam beberapa tipe diabetes, jumlah insulin tidak cukup (biasanya akibat dari menurunnya fungsi sel beta pankreas) untuk memfasilitasi ambilan kembali glukosa dalam sel. Pada kasus lain, insulin diproduksi namun sel tidak dapat mengakui keberadaan insulin. Kondisi ini disebut resistensi insulin (Ulbricht & Seamon, 2010).

Kriteria untuk diagnosis diabetes melitus menurut Asosiasi Diabetes Amerika (ADA) mencakup gejala-gejala (contohnya, poliuria, polidipsia dan kehilangan berat badan tanpa alasan) konsentrasi glukosa plasma yang lebih besar dari 200 mg/dL, serta konsentrasi glukosa plasma puasa lebih dari 126 mg/dL (Brunton, Parker, Blumenthal, & Buxton, 2008).

Secara umum, terdapat empat tipe diabetes melitus (Ulbricht & Seamon, 2010), yaitu:

2.2.1.1 Diabetes tipe 1 (*Insulin-dependent diabetes mellitus*)

Pada diabetes tipe 1, pankreas tidak dapat memproduksi cukup insulin untuk memfasilitasi absorpsi glukosa ke dalam sel. Penyebab dari diabetes ini belum diketahui pasti, dapat karena genetik atau berbagai penyakit lain (seperti infeksi virus). Diabetes tipe 1 umumnya merupakan penyakit autoimun, dimana sistem imun tubuh menyerang sel-selnya sendiri. Pada diabetes tipe ini, sel beta pankreas menjadi target reaksi autoimun sehingga organ tersebut tidak dapat berfungsi secara normal dan tidak dapat mensekresikan insulin. Oleh karena itu, diabetes tipe 1 sering disebut *insulin-dependent diabetes mellitus* (IDDM) yang membutuhkan terapi insulin. Karena diabetes ini sering terjadi pada pasien yang masih muda, maka sering dikenal sebagai *juvenile-onset-diabetes*, namun, diabetes ini juga dapat terjadi pada orang dewasa.

2.2.1.2 Diabetes tipe 2 (*Non-insulin-dependent diabetes mellitus*)

Diabetes tipe 2 sering disebut sebagai *non-insulin-dependent diabetes mellitus* (NIDDM) atau *adult-onset-diabetes* yang lebih sering terjadi pada orang dewasa dan memiliki berat badan yang berlebihan (*overweight*). Diabetes tipe ini sering ditemukan bersamaan dengan komplikasi lain. Pasien dengan diabetes tipe 2 mengalami penurunan produksi insulin dari sel beta pankreas, penurunan

Universitas Indonesia

sensitivitas reseptor insulin di sel, dan penurunan kemampuan pemindahan glukosa ke dalam sel.

2.2.1.3 Diabetes gestasional

Diabetes gestasional merupakan salah satu tipe diabetes yang terjadi selama kehamilan, hal itu disebabkan karena disekresikan hormon oleh plasenta yang menyebabkan resistensi insulin. Wanita yang memiliki kelebihan berat badan sebelum kehamilan, berusia lebih dari 25 tahun, atau memiliki anggota keluarga yang pernah menderita diabetes tipe 2 dapat meningkatkan resiko terjadinya diabetes gestasional. Gejala dari diabetes gestasional mirip dengan diabetes lainnya (polidipsi, poliuri, polifagi) tapi jarang muncul.

2.2.1.4 Sindrom metabolik

Sindrom metabolik (atau sindrom X) merupakan kombinasi dari faktor resiko metabolik mencakup resistensi insulin atau intoleransi glukosa, obesitas, dislipidemia, hipertensi, keadaan protrombik (misalnya kaya fibrinogen), dan keadaan proinflamasi.

2.2.2 Pengobatan Diabetes Melitus

2.2.2.1 Diet dan Olahraga

Diet dan olahraga merupakan langkah pertama dalam pengobatan diabetes melitus tipe 2 (Leyama, Gunawan-Puteri, & Kawabata, 2011). Asosiasi Diabetes Amerika (ADA) memberikan rekomendasi nutrisi bagi pasien pengidap diabetes (Ebadi, 2002), yaitu:

- a. Berat badan tubuh dicapai dan dijaga agar ideal
- b. 55-60% total kalori yang didapatkan berasal dari karbohidrat
- c. Konsumsi makanan yang mengandung karbohidrat dan serat
- d. Konsumsi sukrosa dalam jumlah yang sedikit

2.2.2.2 Obat

Pengobatan diabetes dengan obat-obatan meliputi pemberian insulin, GLP-1, DPP-4 atau antidiabetes oral (sulfonilurea, meglitinid, biguanid, golongan tiazolidindion dan penghambat α -glukosidase).

a. Terapi Insulin

Insulin merupakan pilihan utama untuk pengobatan hampir semua pasien diabetes melitus tipe 1 dan tipe 2. Jika diperlukan, insulin dapat diberikan melalui intravena atau intramuskular, namun, pada pengobatan jangka panjang, umumnya insulin diberikan melalui subkutan. Sediaan insulin diklasifikasikan menurut durasi kerjanya, yaitu kerja cepat, pendek, sedang, dan panjang dan menurut spesies sumbernya (manusia atau babi) (Brunton, Parker, Blumenthal, & Buxton, 2008). Efek samping yang sering terjadi pada penggunaan insulin adalah hipoglikemik dan berat badan bertambah (Dipiro, *et al*, 2005).

b. *Incretin mimetics/Glucagon-Like Peptide Receptor Agonist (GLP-1)*

Glucagon-Like Peptide (GLP-1) adalah hormon yang menstimulasi insulin, menghambat sekresi glukagon, menghambat pengosongan lambung, dan mengurangi nafsu makan. Contoh GLP-1 agonis adalah eksenatid dan pramlintid. Penggunaan eksenatid adalah dengan diinjeksikan secara subkutan dua kali sehari pada penderita diabetes tipe 2. Pramlintid adalah analog peptida sintetik pertama. Efek samping yang sering terjadi pada penggunaan GLP-1 adalah mual, muntah dan diare (Linn, Wofford, O'Keefe, & Posey, 2009).

c. *Incretin enhancers/Dipeptidyl Peptidase-4 Activity Inhibitors (DPP-4)*

Penghambat Dipeptidil Peptidase-4 (DPP-4) menghambat kerja DPP-4 dalam menguraikan inkretin. Penghambat Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) juga bekerja seperti GLP-1 yaitu menstimulasi insulin dan menghambat sekresi glukagon, namun penghambat Dipeptidil Peptidase-4 (DPP-4) tidak menghambat pengosongan lambung. Contoh penghambat Dipeptidil Peptidase-4 (DPP-4) adalah sitagliptin, yang dapat digunakan sebagai terapi tunggal atau dikombinasikan dengan metformin atau pioglitazon (Linn, Wofford, O'Keefe, & Posey, 2009).

Universitas Indonesia

d. Sulfonilurea

Dikenal dua generasi sulfonilurea, generasi satu terdiri dari tolbutamid, tolazamid, asetoheksimid dan klorpropamid. Generasi dua memiliki potensi hipoglikemik lebih besar seperti gliburid (glibenklamid), glipizid, glikazid dan glimepirid. Mekanisme kerja golongan ini adalah merangsang sekresi insulin dari granula sel-sel β -Langerhans pankreas sehingga sering disebut sebagai *insulin secretagogues* (Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2007). Efek samping dari sulfonilurea adalah hipoglikemik, berat badan bertambah dan hiponatremia (Dipiro, *et al*, 2005).

e. Meglitinid

Repaglinid dan nateglinid merupakan golongan meglitinid, mekanisme kerjanya sama dengan sulfonilurea tetapi struktur kimianya sangat berbeda (Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2007).

f. Biguanid

Merupakan obat antihiperglikemik. Dikenal tiga jenis antidiabetik oral dari golongan biguanid, yaitu fenformin, buformin dan metformin. Fenformin telah ditarik dari pasaran karena menyebabkan asidosis laktat. Kini, yang paling banyak digunakan adalah metformin (Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2007). Efek samping yang paling umum terjadi adalah rasa ketidaknyamanan, sakit perut, diare, anoreksia dan rasa kecap logam. Efek samping tersebut dapat diminimalisir dengan pemberian dosis titrasi dan pemberian bersamaan dengan makanan (Dipiro, *et al*, 2005).

g. Golongan Tiazolidindion

Obat-obat ini dapat dikombinasi dengan insulin atau golongan senyawa antidiabetes oral lainnya. (Brunton, Parker, Blumenthal, & Buxton, 2008). Contoh obat golongan ini adalah pioglitazon dan rosiglitazon. Pioglitazon mampu menurunkan kadar trigliserida plasma 10-20%, dimana rosiglitazon cenderung tidak memberikan efek. Pioglitazon tidak memberikan efek yang signifikan

Universitas Indonesia

terhadap LDL kolesterol, namun LDL kolesterol dapat meningkat 5-15% oleh rosiglitazon (Dipiro, *et al*, 2005).

h. Penghambat α -glukosidase

Proses pencernaan dan absorpsi dari karbohidrat dapat diperlambat oleh penghambat α -glukosidase, seperti akarbose dan voglibose yang dapat mengurangi hiperglikemia postprandial dan hiperinsulinemia (Kang, Song, & Zhang, 2011). Kini, penghambat α -glukosidase intestinal menjadi salah satu agen terapeutik yang baik dalam mengatasi gangguan metabolik karbohidrat, khususnya diabetes melitus (Gao, *et al.*, 2010).

2.3 Enzim

Enzim merupakan suatu katalis protein yang berperan penting pada reaksi biokimia spesifik sel mamalia (McPherson & Pinchus, 2007). Enzim bekerja dengan urutan yang teratur dan mampu mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul nutrien, reaksi yang menyimpan dan mengubah energi kimiawi, dan membuat makromolekul dari prekursor sederhana.

Pada beberapa penyakit, terutama gangguan genetik yang menurun, mungkin terdapat kekurangan atau bahkan kehilangan satu atau lebih enzim pada jaringan. Pada keadaan abnormal lainnya, aktivitas yang berlebihan dari suatu enzim tertentu, kadang-kadang dapat dikontrol oleh obat yang dibuat untuk menghambat aktivitas katalitiknya.

Enzim berperan sebagai katalisator yang mampu meningkatkan kecepatan reaksi kimia dengan menurunkan energi aktivasinya (Lehninger, 2000).

2.3.1 Mekanisme Penghambatan Kerja Enzim

Semua zat yang dapat mengurangi kecepatan dari reaksi katalisis enzim disebut inhibitor (penghambat). Inhibitor reversibel berikatan dengan enzim melalui ikatan kovalen. Pelarutan dari kompleks enzim-inhibitor menghasilkan peruraian dari ikatan reversibel inhibitor dan memulihkan kembali aktivitas enzim. Inhibisi ireversibel terjadi saat enzim yang dihambat tidak mendapatkan

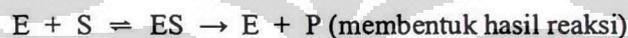
kembali aktivitasnya dengan pelarutan kompleks enzim-inhibitor (Champe & Harvey, 2005).

Terdapat dua jenis inhibitor reversibel (Lehninger, 2000) (lihat Gambar 2.2), yaitu :

2.3.1.1 Inhibitor kompetitif

Inhibitor kompetitif berkompetisi dengan substrat untuk berikatan pada sisi aktif enzim. Ciri inhibitor kompetitif adalah aktivitas penghambatan ini dapat dibalikkan atau diatasi hanya dengan meningkatkan konsentrasi substrat.

Inhibitor kompetitif biasanya menyerupai substrat normal sehingga ia mampu 'menipu' enzim untuk berikatan dengannya. Inhibitor kompetitif (I) dapat berikatan secara reversibel dengan enzim membentuk kompleks EI. Akan tetapi, inhibitor (I) tidak dapat dikatalisis oleh enzim untuk menghasilkan suatu produk reaksi yang baru.

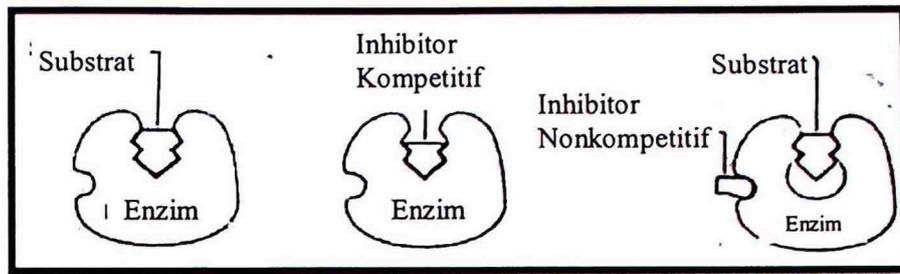


2.3.1.2 Inhibitor nonkompetitif

Pada inhibitor nonkompetitif, inhibitor berikatan pada sisi enzim selain sisi tempat substrat berikatan dengan enzim (sisi aktif), mampu mengubah konformasi molekul enzim sehingga mengakibatkan inaktivasi yang reversibel pada sisi katalitik. Inhibitor nonkompetitif dapat berikatan secara reversibel pada molekul enzim bebas atau kompleks ES, membentuk kompleks EI dan ESI yang tidak aktif.



Keterangan: E = enzim, I = inhibitor; S = substrat; EI = kompleks enzim-inhibitor; ESI = kompleks enzim-substrat-inhibitor.

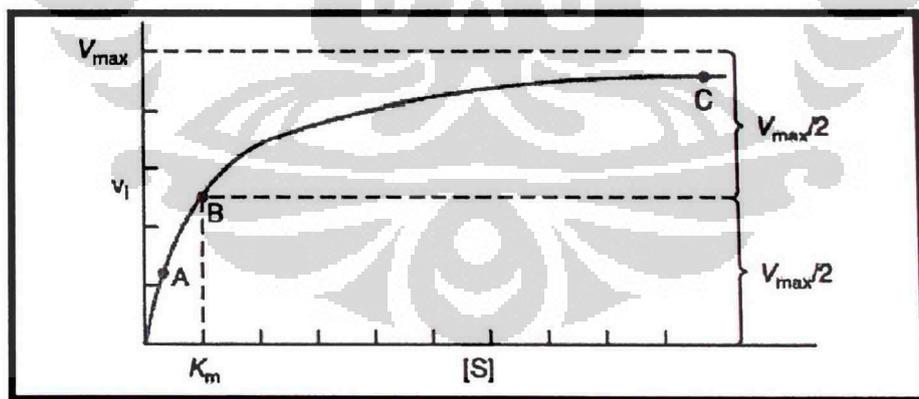


[Sumber: McPherson & Pinchus, 2007]

Gambar 2.2 Perbedaan struktur penghambatan kompetitif dan nonkompetitif

2.3.2 Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim (Lehninger, 2000)

Pada konsentrasi substrat yang amat rendah, kecepatan reaksi pun rendah. Kecepatan ini akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Namun makin lama kecepatan akan meningkat dengan nilai yang semakin kecil hingga mencapai titik batas, yang bila dilampaui, kecepatan reaksi hanya akan meningkat sedemikian kecil dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Bagaimanapun tingginya konsentrasi substrat setelah titik ini tercapai, kecepatan reaksi akan mendekati tetapi tidak pernah mencapai titik maksimum. Pada batas ini disebut kecepatan maksimum (v_{maks}), enzim telah jenuh oleh substratnya dan tidak dapat berfungsi dengan cepat (Gambar 2.3).



[Sumber: Murray, Granner, & Rodwell, 2009]

Gambar 2.3 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi enzimatik

Plot yang menyatakan hubungan antara v_{maks} dengan konsentrasi substrat memiliki bentuk umum yang hampir sama pada semua enzim (berbentuk hiperbola). Michaelis dan Menten mendefinisikan suatu tetapan (sekarang dinyatakan dalam K_m) yang bermanfaat dalam menggambarkan hubungan antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatik. K_m , atau tetapan Michaelis Menten didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimumnya.

Bentuk kejenuhan substrat yang khas bagi suatu enzim dapat dinyatakan secara matematik oleh persamaan Michaelis-Menten (Lehninger, 2000). Bentuk regresi linier dari Persamaan Michaelis-Menten, (Murray, Granner, & Rodwell, 2009, p. 70-71) :

$$v_i = \frac{V_{maks} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

dibalik

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m + [S]}{V_{maks} [S]} \quad (2.2)$$

difaktorkan

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{maks} [S]} + \frac{[S]}{V_{maks} [S]} \quad (2.3)$$

dan disederhanakan

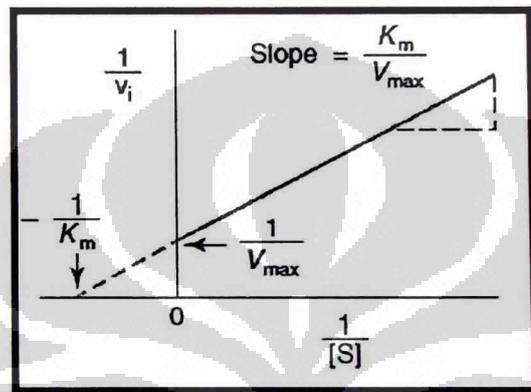
$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_m}{V_{maks}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (2.4)$$

Keterangan : v_i = kecepatan awal reaksi; v_{maks} = kecepatan reaksi maksimal; $[S]$ = konsentrasi substrat; K_m = konstanta Michaelis/konsentrasi substrat dengan kecepatan awal reaksi (v_i) adalah separuh dari kecepatan maksimal ($v_{maks}/2$).

Persamaan (2.4) adalah transformasi persamaan Michaelis-Menten yang disebut persamaan Lineweaver-Burk. Bagi enzim-enzim yang mengikuti hubungan Michaelis-Menten secara tepat, pemetaan $1/v_i$ terhadap $1/[S]$

Universitas Indonesia

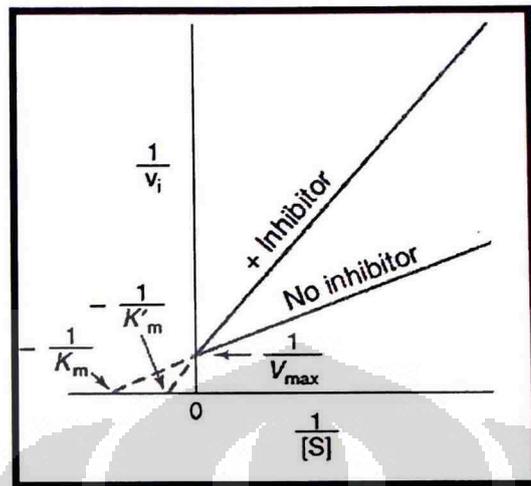
menghasilkan garis lurus (Gambar 2.4). Garis ini akan memiliki sudut K_m/v_{maks} , perpotongan garis terhadap sumbu y sebesar $1/v_{maks}$ (pada sumbu $1/v_i$), dan perpotongan $1/K_m$ pada sumbu $1/[S]$. Pemetaan kebalikan ganda atau Lineweaver-Burk memiliki banyak manfaat, seperti menentukan v_{maks} secara tepat dan juga mampu menganalisa data kinetika enzim.



[Sumber: Murray, Granner, & Rodwell, Biokimia Harper, 2009]

Gambar 2.4 Plot hubungan $1/v_i$ terhadap $1/K_m$

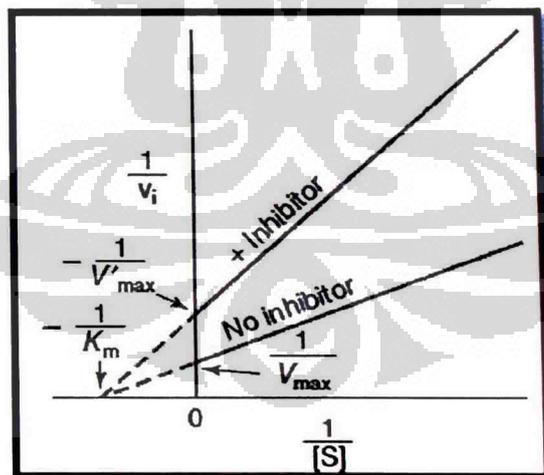
Pada inhibisi kompetitif, garis yang menghubungkan titik data eksperimen bertemu di sumbu y (Gambar 2.5). Karena perpotongan sumbu $y = 1/v_{maks}$, pola ini menunjukkan bahwa ketika $1/[S] = 0$, v_{maks} akan sama seperti pada keadaan tanpa penghambat.



[Sumber: Murray, Granner, & Rodwell, 2009]

Gambar 2.5 Plot Lineweaver-Burk untuk inhibisi kompetitif

Pada inhibisi nonkompetitif, garis yang menghubungkan titik data eksperimen bertemu di sumbu x (Gambar 2.6). Karena perpotongan sumbu $x = 1/K_m$, pola ini menunjukkan bahwa ketika $1/v_i = 0$, K_m akan sama seperti pada keadaan tanpa penghambat.



[Sumber: Murray, Granner, & Rodwell, 2009]

Gambar 2.6 Plot Lineweaver-Burk untuk inhibisi nonkompetitif

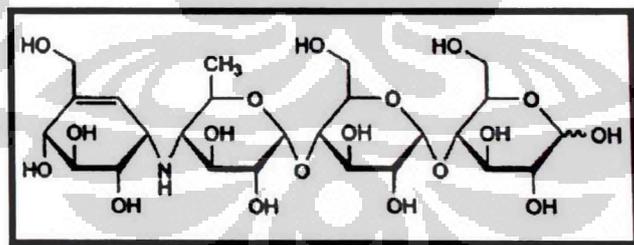
2.3.3 α -Glukosidase

α -Glukosidase merupakan enzim yang terikat di membran usus halus yang mengkatalisis hidrolisis dari polisakarida dan menghambat terjadinya hiperglikemia postprandial. Glukosidase juga berperan penting pada proses biologis seperti dalam sintesis glikoprotein dan katabolisme lisosomal dari konjugat (Wafo, et al., 2011).

2.3.4 Penghambat α -Glukosidase

Penghambat α -glukosidase mengurangi absorpsi intestinal pati, dekstrin, dan disakarida dengan menghambat kerja α -glukosidase pada *brush border* intestinal. Akibat adanya hambatan dalam absorpsi karbohidrat, peningkatan glukosa plasma sesudah makan akan berkurang pada subjek normal maupun diabetik.

Penghambat α -glukosidase dapat digunakan sebagai terapi pada pasien manula atau pada pasien dengan glukosa postprandialnya sangat tinggi. Penghambat α -glukosidase umumnya digunakan dalam kombinasi dengan senyawa antidiabetik oral lain atau dengan insulin. Obat ini sebaiknya diberikan pada awal makan (Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2007).



[Sumber: British Pharmacopoeia 2009, 2008]

Gambar 2.7 Struktur kimia akarbose

Akarbose (Gambar 2.7) merupakan suatu oligosakarida dan miglitol merupakan suatu derivat desoksinojirimisin yang juga menghambat glucoamilase dan sukrase secara kompetitif tetapi memiliki efek yang lemah pada α -amilase pankreatik (Sim, et al., 2010). Keduanya dapat mengurangi kadar glukosa plasma

Universitas Indonesia

sesudah makan pada pasien diabetes melitus tipe 1 dan tipe 2. (Brunton, Parker, Blumenthal, & Buxton, 2008).

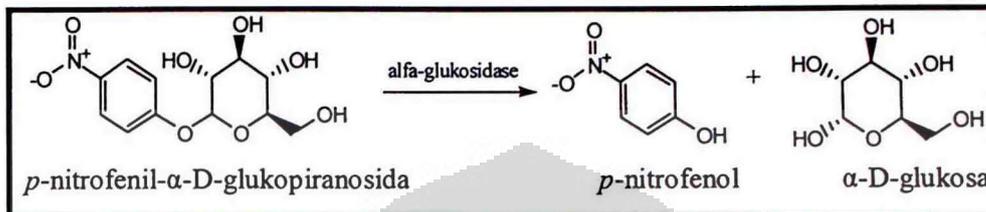
Penghambat α -glukosidase tidak mengakibatkan hipoglikemia, tetapi dapat menyebabkan efek samping yang bersifat *dose dependent*, seperti malabsorpsi, perut kembung (flatulens), diare dan ketidaknyamanan pada perut (Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2007). Efek ini disebabkan karena kerja dari penghambat α -glukosidase yang mengganggu absorpsi karbohidrat sehingga karbohidrat yang tidak tercerna tertumpuk dan masuk ke dalam kolon dan difermentasi oleh flora dalam kolon (Shihabudeen, Pricilla, & Thirumurugan, 2011).

Untuk mengurangi efek samping ini sebaiknya dosis dititrasi, mulai dari dosis awal 25 mg pada saat mulai makan selama 4-8 minggu sampai dosis maksimal 75 mg setiap tepat sebelum makan. Dosis yang lebih kecil dapat diberikan bersamaan dengan kudapan (makanan ringan). Akarbose paling efektif bila diberikan bersama dengan makanan berserat, mengandung polisakarida dengan sedikit kandungan glukosa dan sukrosa (Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2007).

2.3.5 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Banyak perhatian yang telah diberikan untuk mengetahui metode uji penghambatan aktivitas α -glukosidase dari bahan alam. Metode spektrofotometri yang menggunakan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida, dan penghambat α -glukosidase yang berasal dari ragi banyak digunakan dalam uji *in vitro* (Matsumoto, Takemata, Takayama, J.M Abesundara, Matsui, & Katayama, 2002).

α -Glukosidase akan menghidrolisis substrat *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida menjadi *p*-nitrofenol (berwarna kuning) dan α -D-glukosa dengan reaksi sebagai berikut:



[Sumber: Sigma, 1996, telah diolah kembali]

Gambar 2.8 Persamaan reaksi enzimatik α -glukosidase dan *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida

Pengukuran aktivitas dilakukan dengan menggunakan metode *Spectrophotometric Stop Rate Determination* yang didasarkan pada pengukuran absorbansi *p*-nitrofenol (berwarna kuning) yang merupakan hasil reaksi hidrolisis substrat *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida oleh α -glukosidase di samping menghasilkan glukosa (Sigma, 1996).

2.4 Teknik Pemisahan

2.4.1 Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Ekstrak cair adalah sediaan cair simplisia nabati, yang mengandung etanol sebagai pelarut atau sebagai pengawet atau sebagai pelarut dan pengawet. Jika tidak dinyatakan lain pada masing-masing monografi, tiap mL ekstrak mengandung bahan aktif dari 1 g simplisia yang memenuhi syarat. Ekstrak cair yang cenderung membentuk endapan dapat didiamkan dan disaring atau dienaptungkan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995a).

Ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut dari suatu serbuk simplisia, sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut.

Universitas Indonesia

Terdapat beberapa metode ekstraksi dengan pelarut cair (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000), antara lain :

2.4.1.1 Ekstraksi cara dingin

a. Maserasi

Maserasi merupakan prosedur yang sederhana dalam menangani ekstrak dan cocok untuk digunakan sebagai metode ekstraksi dalam skala kecil ataupun skala industri. Maserasi sederhana dilakukan pada temperatur ruang dengan pengocokan simplisia dengan pelarutnya (rasio simplisia dengan pelarut 1:5 atau 1:10) selama beberapa hari. Lalu ekstrak yang didapat dipisahkan dengan penyaringan. Prosedur diulangi sekali atau dua kali dengan menggunakan pelarut segar (Samuelsson, 1999).

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

2.4.1.2 Ekstraksi cara panas

a. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna.

b. Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

Universitas Indonesia

c. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi daripada temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40°-50°C.

d. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96°-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

e. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (≥ 30 menit) dan temperatur sampai titik didih air.

2.4.2 Kromatografi

Kromatografi merupakan suatu cara pemisahan zat berkhasiat dan zat lain yang ada dalam sediaan. Zat yang diperoleh dapat digunakan untuk identifikasi atau penetapan kadar. Kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom merupakan macam kromatografi yang sering digunakan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b).

2.4.2.1 Kromatografi Lapis Tipis (Touchstone & Dobbins, 1983)

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi (pembagian) atau gabungan keduanya. Kromatografi lapis tipis, digunakan untuk mengidentifikasi komposisi campuran dengan cepat, menentukan kondisi percobaan dari kromatografi kolom, memastikan, memisahkan, dan mengidentifikasi suatu komponen dalam campuran obat, ekstrak tanaman, dan preparat biokimia untuk mendeteksi kontaminan dan pemalsuan dan memperoleh analisis kuantitatif dari satu atau lebih komponen.

Pemisahan terjadi dengan melewati pelarut (fase gerak) melintasi lapisan. Aksi kapiler menyebabkan fase gerak berpindah melewati medium, proses ini disebut pengembangan. Semakin banyak informasi mengenai sampel

Universitas Indonesia

yang diketahui, maka akan semakin mudah dalam menentukan fase gerak dan adsorben yang akan digunakan untuk pemisahan.

Lempeng KLT yang telah dikeringkan diamati bercaknya dengan sinar ultraviolet atau dengan pereaksi kimia tertentu. Pereaksi yang digunakan harus tidak merusak senyawa yang akan ditampakan. Pereaksi penampak digunakan dengan cara menyemprotkannya pada lempeng atau mencelupkan lempeng ke dalam pereaksi. Penting untuk diperhatikan pada teknik penyemprotan, bahwa larutan penampak bercak harus tersebar dalam bentuk kabutan halus dan merata. Pereaksi yang umum digunakan adalah uap iodium, asam sulfat pekat, dan campuran asam sulfat pekat dengan kalium bikromat atau dengan asam nitrat.

2.4.2.2 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan salah satu teknik preparatif yang sederhana. Keterbatasan dari kromatografi kolom mencakup proses separasi yang lambat, membutuhkan cukup banyak pelarut, dan inkompatibel dengan partikel bergranul kecil. Salah satu jenis dari kromatografi kolom adalah kromatografi kolom kering.

Metode pada kromatografi kolom kering ialah memasukan bahan kering ke dalam kolom. Sampel yang telah dilarutkan atau dikeringkan dalam jumlah kecil dengan adsorben dan pelarut yang akan menuruni kolom karena adanya aksi kapiler hingga pelarut mencapai bagian bawah kolom. Kromatografi kolom kering merupakan kromatografi kolom konvensional yang mampu memberikan resolusi terbaik, misalnya kolom alumina sepanjang 2 m mampu memisahkan hingga 50 jenis senyawa. Perkembangan dari kromatografi kolom kering disebut sebagai kromatografi kolom kering vakum, dimana vakum yang berasal dari aspirator air digunakan untuk membantu penurunan pelarut dalam kolom. Pengembangan ini mengakibatkan peningkatan kecepatan elusi dan pengurangan waktu fase diam untuk berkontak dengan fase gerak. Namun, selain dari sisi kecepatan elusi, kromatografi kolom kering lebih baik daripada kromatografi kolom kering vakum (Hostettmann & Marston, 2006).

Kromatografi ini dapat digunakan untuk pemisahan campuran dalam skala besar (lebih dari 1 gram). Campuran yang akan dipisahkan diletakan pada bagian

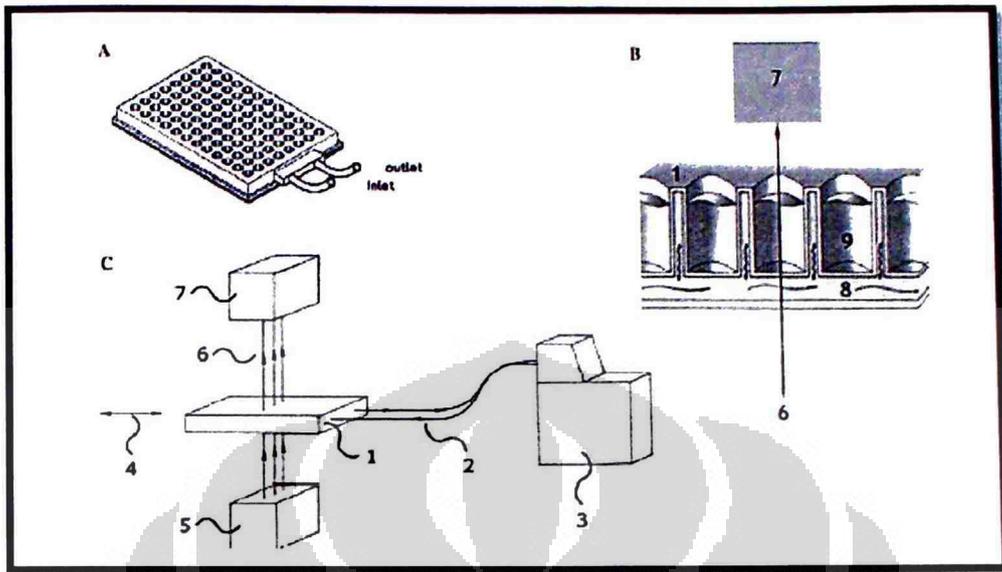
Universitas Indonesia

atas kolom penjerap yang berada dalam tabung kaca, tabung logam atau tabung plastik (Gritter, Bobbit, & Schwarting, 1985).

2.5 *Microplate Reader* (Zakhartsev, Portner, & Blusta, 2003)

Metode analisis aktivitas enzim dengan menggunakan spektrofotometri sudah banyak digunakan. Pengatur suhu eksternal telah umum digunakan dalam metode ini untuk mengatur suhu dari *single-kuvet*. Pengatur suhu eksternal menjamin pengontrolan suhu yang konstan dan akurat melalui rentang suhu yang lebar. Akan tetapi, jumlah sampel yang dapat ditangani secara simultan dalam pembacaan dengan metode spektrofotometri biasanya hanya terbatas dari satu hingga enam buah. Kuvet yang digunakan pada metode spektrofotometri umumnya memiliki volume yang besar (1-4 mL) sehingga membutuhkan reagen yang lebih banyak. Pembatasan jumlah sampel dapat mempengaruhi kualitas statistik dari data yang dikumpulkan karena dapat terjadi kesalahan sistematis yang disebabkan oleh variasi dalam pemipetan.

Alat yang dapat digunakan untuk mengukur aktivitas enzim yang dipengaruhi oleh suhu adalah dengan menggunakan *microplate readers* yang telah dilengkapi oleh pengatur suhu eksternal (Gambar 2.9). Pada umumnya *microplate readers* komersial dengan kontrol temperatur dapat stabil hingga suhu 4-6°C (*lowest point*) dan 40-50°C (*highest point*) pada suhu ruang. Selain itu, *microplate* memiliki 96 sumuran yang menyebabkan proses pengujian dapat berlangsung lebih cepat.



[Sumber: Zakhartsev, Portner, & Blusta, 2003]

Keterangan: (A) Bentuk tiga dimensi dari *microplate*; (B) Bentuk tiga dimensi *microplate* saat pengoperasian; (C) Prinsip kerja utama *microplate*. 1. *microplate*; 2. *insulated flexible tubes*; 3. pengatur suhu eksternal; 4. arah pergerakan *microplate* di *microplate reader*; 5. sumber cahaya; 6. *light beams*; 7. detektor; 8. aliran udara panas; 9. sumuran *microplate* yang terisi oleh sampel cair.

Gambar 2.9 *Microplate readers*

Fitur yang membedakan dari lempeng umumnya adalah ia memiliki ruang kosong di sekitar sumur yang dapat diakses dari sisi bawah lempeng tersebut. Sisi bawah dari *microplate* transparan dan merupakan lempeng kaca dengan kualitas spektrofotometri (ketebalan 1 mm). Total volume dalam tiap sumuran dapat mencapai 300 μL .

Microplate didesain untuk pengukuran pada panjang gelombang 300 hingga 900 nm. Keterbatasan itu dapat terjadi karena sifat optik dari polistirene dan *heat-carrier*. Keduanya secara signifikan menyerap cahaya pada panjang gelombang <280 nm, namun tidak signifikan mengganggu pada >340 nm.

2.6 Penapisan Fitokimia (Harborne, 1987)

Penapisan fitokimia adalah pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan. Pemeriksaan diarahkan pada senyawa metabolit sekunder yang memiliki khasiat

Universitas Indonesia

bagi kesehatan, seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, tanin, glikosida, saponin dan kuinon.

2.6.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya berada dalam bentuk siklik. Sebagian alkaloid beracun bagi manusia dan beberapa ada yang memiliki fungsi fisiologis yang bermakna sehingga dapat digunakan secara luas dalam bidang pengobatan. Alkaloid umumnya tidak berwarna, bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal dan sebagian kecil berbentuk cairan (misalnya nikotin) pada suhu kamar.

2.6.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang larut dalam air dan mengandung sistem aromatik terkonjugasi sehingga mampu menunjukkan pita serapan kuat pada daerah UV. Flavonoid umumnya terdapat dalam tumbuhan, terikat dengan gula sebagai glikosida dengan aglikon flavonoid.

2.6.3 Terpenoid

Terpenoid merupakan senyawa yang dibangun dari dua atau lebih monomer isoprena $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$. Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa, seperti komponen minyak atsiri, yaitu monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap (C_{10} dan C_{15}), diterpen yang lebih sukar menguap (C_{20}), sampai senyawa yang tidak menguap, yaitu triterpenoid dan sterol (C_{30}), serta pigmen karotenoid (C_{40}). Secara kimia, senyawa ini larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan.

2.6.4 Tanin

Tanin banyak terdapat dalam tumbuhan berpembuluh dan terdapat dalam jaringan berkayu pada angiospermae. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air. Secara kimia terdapat dua jenis utama tanin dalam dunia tumbuhan. Tanin terkondensasi terdapat dalam paku-pakuan dan gimnospermae, serta tersebar luas dalam angiospermae,

Universitas Indonesia

terutama jenis tumbuhan berkayu. Pada tanin terhidrolisis, penyebarannya terbatas pada tumbuhan berkeping dua.

2.6.5 Glikosida

Glikosida merupakan bagian karbohidrat terbesar yang terdapat dalam tumbuhan, dapat terikat sebagai oligo- atau polisakarida dan bila dihidrolisis akan terurai menjadi glikon dan aglikon, atau genin. Glikosida dapat dibedakan menjadi α -glikosida dan β -glikosida. Pada tanaman, glikosida biasanya terdapat dalam bentuk β -glikosida.

2.6.6 Saponin

Adanya saponin dalam tumbuhan dapat diketahui dari terbentuknya busa saat mengekstraksi tumbuhan atau saat memekatkan tumbuhan. Pemekatan ekstrak alkohol-air pada tumbuhan yang mengandung saponin sangat sulit, meskipun telah digunakan evaporator. Oleh karena itu, salah satu pengujian saponin sederhana adalah dengan mengocok ekstrak alkohol-air dari tumbuhan dalam tabung reaksi dan diperhatikan terbentuknya busa yang tahan lama pada permukaan cairan. Saponin juga dapat diperiksa dalam ekstrak kasar berdasarkan kemampuannya dalam menghemolisis sel darah. Namun, lebih baik bila uji sederhana tersebut dipastikan dengan KLT dan pengukuran spektrum.

2.6.7 Kuinon

Kuinon merupakan senyawa berwarna dan mempunyai gugus kromofor dasar yang terdiri atas dua gugus karbonil yang berkonjugasi dengan dua ikatan rangkap karbon-karbon. Warna pigmen kuinon alam beragam, mulai dari kuning pucat sampai hampir hitam, dan strukturnya telah dikenal dalam jumlah banyak. Walaupun mereka tersebar luas dan strukturnya sangat beragam, peran pigmen ini terhadap warna tumbuhan pada tumbuhan tinggi relatif kecil karena warnanya dapat tertutupi oleh pigmen lain.

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Laboratorium Penelitian Fitokimia dan Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok, selama kurang lebih empat bulan, dari bulan Februari hingga Juni 2012.

3.2 Bahan

3.2.1 Bahan Uji

Simplisia yang digunakan adalah buah ketapang (*Terminalia catappa* L.) yang yang diperoleh dari sekitar lingkungan Universitas Indonesia pada bulan Februari 2012 dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense (LIPI), Cibinong.

3.2.2 Bahan Kimia

α -Glukosidase yang berasal dari rekombinan *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Aldrich, USA), substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Jepang), dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck, Jerman), *bovine serum albumin* (BSA) (Merck, Jerman), akarbose (PT Dexa Medica), natrium karbonat (Merck, Jerman), kalium dihidrogenfosfat (Analar), etanol 96% (diperoleh dari Bratachem), n-heksana (diperoleh dari Bratachem), etil asetat (diperoleh dari Bratachem), butanol (diperoleh dari Bratachem), metanol (diperoleh dari Bratachem), diklormetan (diperoleh dari Bratachem), akua demineralisata (diperoleh dari Bratachem), iodium (Merck, Jerman), kalium iodida (Merck, Jerman), kloroform, aseton, bismut (III) nitrat (Merck, Jerman), besi (III) klorida, anisaldehyd, aluminium (III) klorida, vanillin, kalium hidroksida (Merck, Jerman), asam asetat glasial (Merck, Jerman), asam asetat anhidrat (Univar, USA), asam sulfat (Merck, Jerman), serbuk asam borat (Merck, Jerman), serbuk asam oksalat (Merck, Jerman), eter, α -naftol, asam nitrat, natrium hidroksida (Univar, USA), kuersetin (Merck, Jerman), lempeng kromatografi lapis tipis silika gel F₂₅₄ (Merck, Jerman), silika gel 60, akuades, air bebas CO₂.

3.3 Alat

Lemari pengering, refrigerator, ayakan, alat giling, alat refluks, oven (Hotpack vacuum oven), timbangan analitik (ACIS AW-X Series), *rotary vacuum evaporator* (Buchi® R11, Switzerland), pH meter (Eutech Instruments), *vortex mixer* (VM 2000), *microplate reader* (BioTek Elx808, USA), *microplate*, pipet mikro, *multichanel pipet* (Thermo Scientific), alat fluoresensi, inkubator, kolom kromatografi dan alat-alat gelas. Adapun beberapa alat tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.1 hingga 3.5.

3.4 Prosedur Pelaksanaan

3.4.1 Penyiapan Simplisia

Buah ketapang yang digunakan adalah buah yang tua tetapi belum matang atau masih berwarna hijau, dan belum gugur pada bulan Februari 2012. Buah ketapang yang telah dikumpulkan, disortasi dan dibersihkan dari pengotor. Setelah selesai dibersihkan, buah ketapang ditimbang. Buah tersebut kemudian diperkecil ukurannya dengan cara ditumbuk, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka dan terlindung dari sinar matahari langsung selama 5 hari karena kandungan air pada buah ketapang cukup banyak. Simplisia buah ketapang yang sudah cukup kering selanjutnya dimasukkan ke dalam lemari pengering dan buah yang kering ditimbang guna menghitung persentase perbandingan berat buah kering terhadap berat buah segar. Simplisia yang telah kering disortasi kembali untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang tertinggal, kemudian dibuat menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan 40 mesh. Serbuk simplisia yang diperoleh, disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya.

3.4.2 Ekstraksi

Serbuk kering simplisia sebanyak 1 kg dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan dilakukan penyarian dengan cara refluks menggunakan pelarut dengan kepolaran yang meningkat. Pertama, serbuk simplisia diekstraksi dengan pelarut n-heksana. Proses ekstraksi diulang sebanyak 6 kali. Ampas dipisahkan dari filtrat dengan penyaring Buchner. Kedua, ampas hasil ekstraksi dengan n-heksana yang

Universitas Indonesia

telah dikeringkan, direfluks dengan pelarut etil asetat. Proses refluks kedua juga diulang sebanyak 6 kali. Ketiga, ampas hasil ekstraksi dengan etil asetat yang telah dikeringkan, direfluks dengan pelarut metanol dan diulang sebanyak 5 kali. Proses ekstraksi dilakukan hingga warna filtrat yang ditampung pudar dan hampir tidak berwarna.

Dalam siklus refluks yang pertama, dibutuhkan pelarut sebanyak 3 liter, sedangkan untuk tiap siklus selanjutnya, pelarut yang dibutuhkan sebanyak 2 liter. Suhu saat proses refluks dijaga 70-80°C dimana satu siklus refluks dilakukan selama 1 jam dihitung setelah pelarut mendidih. Hasil refluks tersebut adalah ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol. Kemudian masing-masing ekstrak yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C hingga didapatkan ekstrak kental. Selanjutnya, ekstrak kental yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui rendemennya dan disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya.

3.4.3 Fraksinasi Ekstrak

Pada penelitian terdahulu, ekstrak yang menunjukkan penghambatan terhadap aktivitas α -glukosidase terbesar ditunjukkan pada fraksi etil asetat yang dipartisi dengan corong pisah dari ekstrak etanol 70% sehingga pada penelitian ini dipilih ekstrak etil asetat untuk selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi kolom. Untuk mengetahui eluen yang menghasilkan pemisahan yang baik, terlebih dahulu diperiksa dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam yang dipilih untuk kromatografi kolom adalah silika gel, dan pengemasannya dilakukan dengan cara basah. Ekstrak dielusi secara gradien menggunakan eluen campuran diklormetan-etil asetat dan dilanjutkan dengan etil asetat-metanol. Konsentrasi eluen diturunkan 5% tiap 200 mL jika pita warna yang terbentuk tidak turun kembali dan ditampung dengan menggunakan vial kaca berukuran 100 mL. Pemasukan ekstrak ke dalam kolom dilakukan dengan cara kering.

Fraksi yang diperoleh dilihat pola kromatogramnya dengan KLT menggunakan eluen yang sesuai. Fraksi-fraksi yang memiliki pola kromatogram yang mirip digabung dan dikentalkan menggunakan evaporator. Setelah kental,

Universitas Indonesia

hasil gabungan fraksi yang memiliki bobot lebih dari 100 mg dilakukan uji penghambatan terhadap aktivitas α -glukosidase yang sama seperti uji pada ekstrak. Fraksi yang menunjukkan penghambatan aktivitas paling besar dilakukan penapisan fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang terdapat di dalamnya.

3.4.4 Uji Pendahuluan Aktivitas α -Glukosidase

Sebelum dilakukan uji penghambatan α -glukosidase perlu dilakukan uji pendahuluan aktivitas α -glukosidase. Hal ini bertujuan untuk mengetahui kondisi yang optimal agar enzim bekerja secara optimal, sehingga nantinya uji aktivitas penghambatan α -glukosidase dilakukan berdasarkan kondisi dimana aktivitas enzim paling baik. Uji pendahuluan yang dilakukan adalah optimasi konsentrasi substrat. Uji ini dilakukan pada larutan blanko dan kontrol blanko. Sebelum dilakukan pengujian, terlebih dahulu dilakukan penyiapan larutan enzim, larutan substrat, larutan Na_2CO_3 200 mM dan larutan dapar fosfat pH 6,8.

3.4.4.1 Penyiapan Larutan Pereaksi

a. Larutan dapar fosfat pH 6,8 (United States Pharmacopoeial Convention, 2007)

Dapar fosfat pH 6,8 dibuat dengan mencampurkan 125,0 mL kalium dihidrogenfosfat 0,2 M dengan 56,0 mL natrium hidroksida 0,2 M dan diencerkan dengan air demineralisata CO_2 hingga 500,0 mL.

Kalium dihidrogenfosfat 0,2 M dibuat dengan melarutkan 6,805 g kalium dihidrogenfosfat dalam akua demineralisata bebas CO_2 dan diencerkan hingga 250,0 mL.

Natrium hidroksida 0,2 M dibuat dengan melarutkan 1,6 g NaOH dalam air demineralisata bebas CO_2 hingga 200,0 mL.

b. Larutan α -glukosidase

Larutan enzim dibuat dengan menimbang 5,0 mg α -glukosidase dilarutkan dalam 100 mL larutan BSA dalam kondisi dingin. Kemudian larutan induk enzim diencerkan dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga diperoleh larutan enzim 0,05 U/mL.

Larutan enzim yang disimpan adalah larutan induk enzim/larutan induk sebelum dilakukan pengenceran. Idealnya enzim tidak disimpan, namun jika disimpan diusahakan selesai dalam waktu beberapa bulan apabila disimpan pada suhu -20°C , dan dalam waktu beberapa minggu bila disimpan pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$.

Larutan enzim dibuat pada kondisi suhu rendah ($2-8^{\circ}\text{C}$). Namun, pada saat akan diuji, suhu larutan enzim harus dipastikan berada pada suhu ruangan (Sigma, 1996).

c. Larutan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG)

Dibuat larutan PNPG 10 mL dengan konsentrasi 20 mM. BM p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG): 301,25 (Sigma, 1996).

$$\text{mM} = \frac{\text{mg}}{\text{BM}} \times \frac{1000}{\text{mL}} \quad (3.1)$$

$$\text{mg} = \frac{\text{mM} \times \text{BM} \times \text{mL}}{1000} \quad (3.2)$$

$$\text{mg} = \frac{20 \times 301,25 \times 10,0}{1000} = 60,25 \text{ mg}$$

Larutan substrat 20 mM dibuat dengan cara melarutkan 60,25 mg p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) dalam 10,0 mL akua demineralisata bebas CO_2 . Larutan substrat dapat diencerkan dengan akua demineralisata bebas CO_2 hingga diperoleh larutan substrat 20; 10; 5; 2,5; 1,25 dan 0,625 mM sehingga dalam pengujian diperoleh konsentrasi akhir masing-masing 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 dan 0,0312 mM. Larutan substrat untuk pengujian harus segar dan harus segera digunakan setelah dibuat.

d. Larutan natrium karbonat 200 mM

Serbuk natrium karbonat (Na_2CO_3) sejumlah 10,6 g ditimbang kemudian dilarutkan dengan 500 mL akua demineralisata bebas CO_2 sehingga mencapai konsentrasi 200 mM. pH natrium karbonat yang digunakan adalah 9,1.

3.4.4.2 Prosedur Uji Pendahuluan Konsentrasi Substrat (Basuki, Dewiyanti, Artanti, & Kardono; Choudhary, et.al., 2011)

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 2 μL dimetil sulfoksida (DMSO), 63 μL dapar fosfat pH 6,8 dan 10 μL p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi masing-masing 20; 10; 5; 2,5; 1,25 dan 0,625 mM, sehingga diperoleh konsentrasi akhir masing-masing 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 dan 0,0312 mM lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Untuk larutan uji, tambahkan 25 μL larutan enzim dan selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 100 μL natrium karbonat 200 mM. p-Nitrofenol yang dihasilkan dibaca absorbansinya pada λ 405 nm dengan *microplate reader*. Pada uji larutan kontrol, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim (Tabel 3.1).

Tabel 3.1 Prosedur Optimasi Konsentrasi Substrat

Reagen	Volume (μL)	
	Uji	Kontrol
DMSO	2	2
Dapar fosfat pH 6,8	63	63
Substrat (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 dan 0,0312 mM)	10	10
Inkubasi pada 37°C, 5 menit		
Enzim	25	-
Natrium karbonat 200 mM	-	100
Inkubasi pada 37°C selama 30 menit		
Enzim	-	25
Natrium karbonat 200 mM	100	-
Ukur absorbansi pada $\lambda = 405$ nm dengan <i>microplate reader</i>		

b. Perhitungan Aktivitas Enzim (Sigma, 1996)

$$\text{Unit/mL enzim} = \frac{(A_U - A_B) \times V \times df}{18,3 \times V_e \times t} \quad (3.3)$$

$$\text{Unit/mg enzim} = \text{Unit/mL enzim} \times \frac{1}{C} \quad (3.4)$$

Keterangan : A_U = Serapan sampel; A_B = serapan blanko; V = volume total (mL); df = faktor pengenceran; 18,3 = Ekstinsi milimolar p-nitrofenol pada 400 nm; V_e = Volume enzim (mL); t = Waktu inkubasi (menit); C = Banyaknya α -glukosidase dalam larutan (mg/mL).

Definisi Unit: (Sigma, 1996)

Satu unit akan melepaskan 1,0 μmol D-glukosa dari p-nitrofenil- α -D-glukosida per menit pada pH 6,8 dan suhu 37°C.

3.4.5 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Uji penghambatan aktivitas α -glukosidase dilakukan terhadap larutan blanko, yaitu larutan uji tanpa sampel/standar, larutan akarbose sebagai standar pembandingan, larutan ekstrak serta larutan fraksi sebagai sampel yang dilakukan sesuai dengan kondisi optimasi yang diperoleh. Setiap larutan uji memiliki larutan kontrol masing-masing, yaitu larutan uji dengan penambahan natrium karbonat terlebih dahulu sebelum penambahan enzim. Sebelum dilakukan pengujian, terlebih dahulu dilakukan penyiapan larutan akarbose dan penyiapan larutan sampel. Berikut ini ialah prosedur dalam menentukan penghambatan aktivitas α -glukosidase (Tabel 3.2).

3.4.5.1 Penyiapan Larutan Akarbose

Sebanyak 10,2 mg akarbose dilarutkan dalam 10,0 mL dapar fosfat pH optimum hingga diperoleh konsentrasi larutan 1020 ppm.

3.4.5.2 Penyiapan Larutan Sampel

Sebanyak 16,4 mg ekstrak n-heksana; 10,1 mg ekstrak etil asetat, dan 11,5 mg ekstrak metanol serta 10,0 mg fraksi G dilarutkan dengan 3 mL dimetil sulfoksida kemudian dicukupkan volumenya dengan dapar fosfat pH 6,8 pada labu ukur 10,0 mL sehingga didapatkan larutan ekstrak dengan konsentrasi

masing-masing 1640; 1010; 1150 serta 1000 ppm. Pada ekstrak yang tidak larut dalam dapar fosfat, ekstrak dilarutkan dan diencerkan menggunakan larutan dimetilsulfoksida.

3.4.5.3 Pengujian Kontrol Blanko (KB)

Sebanyak 2 μL larutan dimetil sulfoksida (DMSO) ditambah dengan 63 μL dapar fosfat pH 6,8 dan 10 μL larutan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNP-G) 10 mM. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C dan ditambahkan 100 μL Na_2CO_3 200 mM. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 25 μL larutan enzim 0,05 U/mL. Larutan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada λ 405 nm.

3.4.5.4 Pengujian Blanko (B)

Sebanyak 2 μL larutan dimetil sulfoksida (DMSO) ditambah dengan 63 μL dapar fosfat pH 6,8 dan 10 μL larutan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNP-G) 10 mM. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C dan ditambahkan 25 μL larutan enzim 0,05 U/mL. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 100 μL Na_2CO_3 200 mM. Larutan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada λ 405 nm.

3.4.5.5 Pengujian Kontrol Akarbose

Sebanyak 10; 15; 20; 30; 40 μL larutan akarbose ditambah dengan 55; 50; 45; 35; 25 μL dapar fosfat pH 6,8 (secara berturut-turut untuk konsentrasi 51; 76,5; 102; 153; 204 ppm) dan 25 μL larutan substrat p-nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) 10 mM. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C dan ditambahkan 100 μL Na_2CO_3 200 mM. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 25 μL larutan enzim 0,05 U/mL. Larutan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada λ 405 nm.

3.4.5.6 Pengujian Akarbose

Sebanyak 10; 15; 20; 30; 40 μL larutan akarbose ditambah dengan 55; 50; 45; 35; 25 μL dapar fosfat pH 6,8 (secara berturut-turut untuk konsentrasi 51; 76,5; 102; 153; 204 ppm) dan 10 μL larutan substrat p-nitrofenil $\alpha\text{-D}$ -glukopiranosida (PNP-G) 10 mM. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C dan ditambahkan 25 μL larutan enzim 0,05 U/mL. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 100 μL Na_2CO_3 200 mM. Larutan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada λ 405 nm.

3.4.5.7 Pengujian Kontrol Sampel (KS)

Sebanyak 2; 5; 10; 15; 20 μL larutan ekstrak n-heksana ditambah dengan 63; 60; 55; 50; 45 μL dapar fosfat pH 6,8 (secara berturut-turut untuk konsentrasi 16,4; 32,8; 41; 82; 123 ppm) dan 10 μL larutan substrat p-nitrofenil $\alpha\text{-D}$ -glukopiranosida (PNP-G) 10 mM. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C dan ditambahkan 100 μL Na_2CO_3 200 mM. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 25 μL larutan enzim 0,05 U/mL. Larutan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada λ 405 nm.

Hal yang serupa dilakukan untuk ekstrak etil asetat sebanyak 2; 5; 10; 15; 20 μL dalam 63; 60; 55; 50; 45 μL dapar fosfat pH 6,8 (secara berturut-turut untuk konsentrasi 10,1; 25,25; 50,5; 75,75; 101 ppm) dan larutan ekstrak metanol sebanyak 5; 10; 15; 20; 30 μL dalam 60; 55; 50; 45; 35 μL dapar fosfat pH 6,8 (secara berturut-turut untuk konsentrasi 28,7; 57,4; 86,1; 114,8; 172,2 ppm). Sedangkan untuk tiap fraksi dibuat campuran dari larutan fraksi 5; 10; 15; 20; 30 μL dalam 60; 55; 50; 45; 35 μL dapar fosfat pH 6,8 (secara berturut-turut untuk konsentrasi 25; 50; 75; 100; 150 ppm).

3.4.5.8 Pengujian Sampel (S)

Sebanyak 2; 5; 10; 15; 20 μL larutan ekstrak n-heksana ditambah dengan 63; 60; 55; 50; 45 μL dapar fosfat pH 6,8 (secara berturut-turut untuk konsentrasi 16,4; 32,8; 41; 82; 123 ppm) dan 10 μL larutan substrat p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) 10 mM. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C dan ditambahkan 25 μL larutan enzim 0,05 U/mL. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 100 μL Na_2CO_3 200 mM. Larutan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada λ 405 nm.

Hal yang serupa dilakukan untuk ekstrak etil asetat sebanyak 2; 5; 10; 15; 20 μL dalam 63; 60; 55; 50; 45 μL dapar fosfat pH 6,8 (secara berturut-turut untuk konsentrasi 10,1; 25,25; 50,5; 75,75; 101 ppm) dan larutan ekstrak metanol sebanyak 5; 10; 15; 20; 30 μL dalam 60; 55; 50; 45; 35 μL dapar fosfat pH 6,8 (secara berturut-turut untuk konsentrasi 28,7; 57,4; 86,1; 114,8; 172,2 ppm). Sedangkan untuk tiap fraksi dibuat campuran dari larutan fraksi 5; 10; 15; 20; 30 μL dalam 60; 55; 50; 45; 35 μL dapar fosfat pH 6,8 (secara berturut-turut untuk konsentrasi 25; 50; 75; 100; 150 ppm).

Tabel 3.2 Prosedur Uji Aktivitas Penghambat α -Glukosidase

Reagen	Volume (μL)			
	Kontrol Blanko	Blanko	Kontrol Sampel	Sampel
Ekstrak/fraksi/ Akarbose	-	-	x	x
DMSO	2	2	-	-
Dapar fosfat	63	63	65-x	65-x
Substrat	10	10	10	10
Inkubasi pada 37°C , 5 menit				
Enzim	-	25	-	25
Natrium karbonat	100	-	100	-
Inkubasi pada 37°C , 30 menit				
Enzim	25	-	25	-
Natrium karbonat	-	100	-	100

Ukur absorbansi pada $\lambda = 405$ nm dengan *microplate reader*

Keterangan: x: ekstrak n-heksana dan etil asetat: 2; 5; 10; 15; 20 μL
 ekstrak metanol: 5; 10; 15; 20; 30 μL
 fraksi: 5; 10; 15; 20; 30 μL
 akarbose: 10; 15; 20; 30; 40 μL

Persen inhibisi α -glukosidase dapat dihitung dengan rumus (Gholamhoseinian, Fallha, Sharifi-far, & Mirtajaddini, 2008, p.3):

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{OD kontrol} - \text{OD test}}{\text{OD kontrol}} \times 100\% \quad (3.5)$$

Keterangan: OD = *Optical Density*; OD kontrol = serapan B yang dikoreksi oleh KB; OD test = serapan S yang dikoreksi oleh KS.

IC₅₀ dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Dari persamaan: $y = a + bx$ dapat dihitung nilai IC₅₀ dengan menggunakan rumus :

$$\text{IC}_{50} = \frac{50 - a}{b} \quad (3.6)$$

3.4.6 Uji Kinetika Penghambatan Enzim

Uji kinetika penghambatan aktivitas enzim diukur dengan meningkatkan konsentrasi p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida sebagai substrat. Ekstrak yang akan digunakan sebagai penghambat aktivitas enzim merupakan fraksi aktif yang memiliki penghambatan aktivitas enzim tertinggi.

Sebanyak 10 μL larutan fraksi aktif dengan dalam 55 μL dapar fosfat pH 6,8 (untuk konsentrasi 50 ppm) dan 10 μL larutan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNP-G) dengan 4 konsentrasi akhir yang berbeda-beda, yaitu 0,0625; 0,125; 0,25 dan 0,5 mM. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Lalu ditambahkan 25 μL larutan enzim dengan konsentrasi 0,05 U/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 100 μL Na₂CO₃ 200 mM untuk menghentikan reaksi. Larutan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada λ 405 nm. Setiap pengujian dilakukan koreksi, yaitu dengan penambahan natrium karbonat terlebih dahulu sebelum penambahan enzim (kontrol) (Tabel 3.3).

Jenis penghambatan kompetitif atau nonkompetitif dapat ditentukan dengan analisis data menggunakan *Lineweaver-Burke* untuk mendapatkan tetapan kinetika *Michaelis-Menten* yang dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = a +$

bx, di mana $\frac{1}{[S]}$ sebagai sumbu x dan $\frac{1}{v_i}$ sebagai sumbu y, sehingga akan diperoleh tetapan *Michaelis-Menten* (Murray, Granner, & Rodwell, 2009, p.71) sebagai berikut:

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_m}{V_{maks}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (3.7)$$

$$y = 0 \rightarrow 0 = bx + a$$

$$x = \frac{-a}{b} = \frac{-1}{K_m}$$

$$K_m = \frac{b}{a} \quad (3.8)$$

Dalam persamaan *Lineweaver-Burke* tersebut, [S] dapat dianalogikan sebagai konsentrasi substrat, sedangkan v_i dapat dianalogikan sebagai besar serapan sampel.

Penghambatan kompetitif ditunjukkan dengan grafik *Lineweaver-Burke* di mana sampel yang mengandung penghambat akan membentuk perpotongan garis di sumbu y dengan blanko, sedangkan penghambat nonkompetitif ditunjukkan dengan grafik *Lineweaver-Burke* di mana sampel yang mengandung penghambat akan membentuk perpotongan garis di sumbu x dengan blanko (Champe & Harvey, 2005).

Tabel 3.3 Prosedur Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim

Reagen	Volume (μL)			
	Tanpa Inhibitor (TI)	Kontrol TI	Dengan Inhibitor (DI)	Kontrol DI
Fraksi	-	-	10	10
DMSO	2	2	-	-
Dapar	63	63	55	55
Substrat	10	10	10	10
Inkubasi pada 37°C selama 5 menit				
Enzim	25	-	25	-
Na ₂ CO ₃	-	100	-	100
Inkubasi pada 37°C selama 30 menit				
Enzim	-	25	-	25
Na ₂ CO ₃	100	-	100	-
Ukur absorbansi pada $\lambda = 405 \text{ nm}$ dengan <i>microplate reader</i>				

3.4.7 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia (Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984)

3.4.7.1 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dengan Kromatografi Lapis Tipis

Fraksi teraktif buah ketapang (fraksi G) ditimbang sejumlah 5 mg dan dilarutkan dalam 5 mL aseton untuk diidentifikasi golongan senyawa kimianya dengan kromatografi lapis tipis, kecuali identifikasi glikosida (dengan menggunakan pereaksi kimia). KLT dapat dibuat dengan lempeng silika gel dengan berbagai jenis fase gerak dengan perbandingan tertentu.

Pola kromatogram dapat ditunjukkan dengan pengamatan bercak dengan sinar ultraviolet atau dengan pereaksi kimia tertentu sesuai dengan literatur yang diketahui, antara lain:

a. Identifikasi alkaloid

Pengamatan bercak dapat dilakukan dengan sinar ultra violet pada λ 254 nm dan 365 nm atau dengan pereaksi penyemprot, yaitu pereaksi dragendorf

(coklat-oranye-kecoklatan), pereaksi iodoplatina (coklat), ataupun dengan pereaksi khusus, misalnya untuk alkaloid purin menggunakan pereaksi iodida-kalium iodida-HCl.

b. Identifikasi flavonoid

Pengamatan bercak dapat diamati pada λ 254 nm dan 365 nm (fluoresensi kuning gelap, hijau, biru) dengan pereaksi penyemprot berupa pereaksi aluminium (III) klorida.

c. Identifikasi terpen

Identifikasi triterpen menggunakan pereaksi semprot vanillin/asam sulfat, kemudian dipanaskan selama 6 menit pada suhu 100°C. Bercak yang muncul berupa spot berwarna ungu.

d. Identifikasi tanin

Pengamatan bercak dapat dilakukan dengan penyemprotan lempeng dengan besi (III) klorida. Bercak yang muncul berupa spot berwarna hijau kehitaman.

e. Identifikasi saponin

Pengamatan bercak dapat dilakukan dengan pereaksi penyemprot berupa pereaksi vanillin-asam sulfat atau anisaldehyd-asam sulfat yang akan menimbulkan warna biru atau biru-volet, tetapi kadang-kadang merah atau kuning kecoklatan.

f. Identifikasi antrakuinon

Lempeng KLT disemprot dengan 10 mL larutan potasium hidroksida (KOH)/etanol 5-10% (reaksi Borntrager). Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya bercak berwarna coklat.

3.4.7.2 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dengan Pereaksi Kimia

a. Identifikasi Alkaloid (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b)

Fraksi teraktif (fraksi G) sejumlah 5 mg dilarutkan dengan 9 mL air suling dan 1 mL asam klorida 2 N (9:1), kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit. Selanjutnya didinginkan dan disaring. Filtrat yang didapatkan diambil sejumlah 1 mL dan ditambahkan 2 tetes Bouchardat. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan coklat hitam. Pada 1 mL filtrat juga dapat ditambahkan 2 tetes Mayer atau Dragendorf. Hasil positif terhadap Mayer ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau kuning yang larut dalam metanol sedangkan hasil positif terhadap Dragendorf ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga coklat.

b. Identifikasi Flavonoid (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b)

Fraksi teraktif (fraksi G) sejumlah 5 mg ditambahkan 4 mL etanol 95% hingga fraksi larut. Filtrat yang didapatkan diambil sejumlah 2 mL dan ditambahkan 0,5 gram serbuk seng, 2 mL asam klorida 2 N pun ditambahkan. Larutan didiamkan 1 menit. Kemudian ditambahkan 10 tetes asam klorida pekat, dikocok perlahan, dan diamkan 2-5 menit. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah intensif.

Selain itu, pada filtrat sejumlah 2 mL dapat pula ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium lalu ditambahkan 10 tetes asam klorida pekat, dikocok perlahan. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah jingga hingga merah ungu atau hasil positif flavon, kalkon, auron ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning jingga.

Fraksi teraktif (fraksi G) sejumlah 5 mg dibasahkan dengan aseton, kemudian ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat dan asam oksalat dalam cawan penguap, dipanaskan hati-hati dan hindari pemanasan berlebihan. Sisa yang didapat ditambahkan dengan 10 mL eter. Amati dengan sinar ultraviolet 366 nm. Hasil positif flavonoid ditunjukkan bila larutan berfluoresensi kuning intensif.

c. Identifikasi Terpenoid/sterol (Farnsworth, 1966)

Dilakukan reaksi Liebermann-bouchard : Fraksi teraktif (fraksi G) sejumlah 5 mg ditambahkan 5 mL larutan eter, lalu diuapkan di dalam cawan penguap, ke dalam residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat, dan 1 tetes asam sulfat pekat. Hasil positif terpen/sterol ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah-hijau-violet-biru.

d. Identifikasi Tanin (Farnsworth, 1966)

Fraksi teraktif (fraksi G) sejumlah 5 mg dilarutkan dalam 5 mL air suling panas dan diaduk. Setelah dingin disentrifugasi dan bagian cairan didekantir dan diberi larutan natrium klorida 10% kemudian disaring. Filtrat yang didapatkan diambil sejumlah 1 mL dan ditambahkan 3 mL larutan gelatin 10% atau NaCl-gelatin 1% (larutan gelatin 1% dalam larutan natrium klorida 10%). Hasil positif adanya tanin ditunjukkan dengan terbentuknya endapan.

Selain itu, sejumlah 1 mL filtrat dapat juga ditambahkan dengan 2 tetes larutan FeCl_3 3%. Hasil positif tanin ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi hijau violet.

e. Identifikasi Glikon (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b)

Fraksi teraktif (fraksi G) sejumlah 5 mg dilarutkan dalam 20 mL etanol 70%, dan ditambahkan 25 mL air dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M, kemudian dikocok, didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari tiga kali, tiap kali dengan 20 mL campuran kloroform dan isopropanol (3:1). Pada kumpulan sari ditambahkan natrium sulfat anhidrat, disaring dan diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50°C . Sisa dilarutkan dengan 2 mL metanol. Filtrat yang didapatkan diambil 1 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam tabung reaksi, sisanya dilarutkan dengan 2 mL air dan 5 tetes Molisch. Kemudian ditambahkan dengan hati-hati 2 mL asam sulfat (Reaksi Molisch). Hasil positif adanya glikon ditunjukkan dengan terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan.

f. Identifikasi Saponin (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b)

Fraksi teraktif (fraksi G) sejumlah 5 mg ditambahkan 10 mL air suling panas, didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik, kemudian didiamkan selama 10 menit. Hasil positif saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap setinggi 1 hingga 10 cm dan pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang.

g. Identifikasi Kuinon/Antrakuinon (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b)

Fraksi teraktif (fraksi G) sejumlah 5 mg ditambahkan 10 mL air panas. Kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit, filtrat yang terbentuk disaring. Sejumlah 5 mL filtrat ditambahkan beberapa tetes larutan natrium hidroksida 1 N. Hasil positif kuinon ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah.

Fraksi teraktif (fraksi G) sejumlah 5 mg dilarutkan dengan 5 mL asam sulfat 2N, kemudian dipanaskan sebentar dan dinginkan. Selanjutnya ditambahkan 10 mL benzen, dikocok, dan didiamkan. Lapisan benzen dipisahkan, disaring, Hasil positif antrakuinon ditunjukkan dengan filtrat yang berwarna kuning. Lapisan benzen dikocok dengan 1 mL sampai 2 mL natrium hidroksida 2 N, diamkan, lapisan air akan berwarna merah intensif dan lapisan benzena tidak berwarna.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Bahan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah ketapang (*Terminalia catappa* L.) dari famili Combretaceae, yang diperoleh dari sekitar lingkungan FMIPA Universitas Indonesia. Bahan ini dipilih berdasarkan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa fraksi etil asetat buah ketapang mampu memberikan penghambatan terhadap aktivitas α -glukosidase sehingga dapat digunakan sebagai antidiabetes. Tanaman ini dideterminasi di Herbarium Bogoriense (LIPI), Cibinong. Hasil determinasi menyatakan bahwa tanaman uji merupakan tanaman ketapang (*Terminalia catappa* L.) yang dapat dilihat pada Lampiran 1. Buah ketapang yang digunakan adalah buah (beserta bijinya) yang tua tetapi belum matang/masih berwarna hijau dan belum gugur saat bulan Februari 2012 (Gambar 4.1).



[Sumber: Dokumentasi Pribadi]

Gambar 4.1 Buah ketapang

Buah ketapang yang telah dikumpulkan selanjutnya disortasi dan dibersihkan dari pengotor seperti tanah, kerikil dan bagian tanaman lain yang mungkin ikut terbawa saat pengambilan tanaman. Setelah disortir, buah ketapang ditimbang. Bobot buah ketapang segar adalah 9476,8 gram. Buah tersebut kemudian dikecilkan ukurannya dengan cara ditumbuk, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka dan terlindung dari sinar matahari langsung selama 5 hari.

Simplisia buah ketapang yang sudah cukup kering selanjutnya dimasukkan ke dalam lemari pengering selama 1 hari. Buah ketapang yang telah kering ditimbang guna menghitung persentase perbandingan berat buah kering terhadap berat buah segar. Bobot buah ketapang kering adalah 3248,6 gram. Hasil persentase perbandingan berat buah kering terhadap berat buah segar dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air dalam simplisia sehingga dapat mencegah perusakan simplisia dari pembusukkan. Simplisia yang telah kering disortasi kembali untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang tertinggal. Kemudian simplisia yang telah dihilangkan pengotornya, dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan alat penggiling dan diayak dengan ayakan 40 mesh. Penyerbukan simplisia mampu meningkatkan efektivitas dari proses ekstraksi. Proses pembuatan serbuk simplisia dapat mempengaruhi mutu ekstrak. Makin halus serbuk simplisia, proses ekstraksi akan makin efektif dan efisien, namun makin rumit pula secara teknologi peralatan untuk tahapan filtrasi (DepKes RI, 2000). Serbuk simplisia disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya untuk mencegah perusakan dan penurunan mutu.

4.2 Ekstraksi Simplisia

Serbuk simplisia kering sebanyak ± 1 kg diekstraksi dengan cara panas, yaitu refluks pada suhu $70-80^{\circ}\text{C}$ selama satu jam dengan metode ekstraksi bertingkat. Total serbuk simplisia yang diekstraksi adalah 2996,4 gram. Cara refluks dipilih karena metode ini merupakan salah satu metode yang sudah biasa digunakan untuk uji penghambatan aktivitas α -glukosidase selain dari metode maserasi, sokhlet dan perkolasi (Kim K. Y., Nam, Kurihara, & Kim S. M., 2008). Selain itu, metode refluks dipilih karena metode tersebut mudah dan cepat dalam pengerjaannya. Ekstraksi dilakukan dari pelarut non polar hingga pelarut yang lebih polar, yaitu n-heksana, etil asetat dan metanol.

Masing-masing filtrat hasil ekstraksi kemudian disaring dengan penyaring Buchner agar terpisah dari ampasnya. Ampas kemudian diekstraksi kembali hingga tujuh kali (hingga warna filtrat pudar dan hampir tidak berwarna) agar

Universitas Indonesia

jumlah senyawa yang tersari dapat diperoleh lebih banyak dan untuk memastikan bahwa dalam simplisia yang disari tidak lagi mengandung senyawa berkhasiat. Seluruh filtrat yang diperoleh ditampung dan diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40-50°C dengan kecepatan 40 rpm hingga ekstrak mengental sehingga diperoleh ekstrak kental n-heksana, etil asetat dan metanol. Skema pengerjaan ekstraksi dapat dilihat pada Lampiran 2. Ekstrak dikentalkan dengan tujuan untuk meningkatkan jumlah partikel solute (senyawa terlarut) sehingga diharapkan dapat mempermudah proses identifikasi (Depkes RI, 2000).

Kemudian ekstrak kental yang diperoleh ditimbang untuk menghitung rendemen dan kemudian disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya. Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (DepKes RI, 2000). Hasil ekstraksi dan rendemen masing-masing ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.2.

4.3 Fraksinasi

Ekstrak kental etil asetat kemudian difraksinasi menggunakan pelarut dengan kepolaran yang semakin meningkat mulai dari pelarut yang lebih bersifat nonpolar hingga pelarut yang lebih polar. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom (KK) dengan teknik elusi normal karena diharapkan dapat memisahkan banyak senyawa dengan cukup baik.

Sebelum dilakukan kromatografi kolom harus dilakukan pemilihan eluen dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Eluen yang akan dipilih untuk KK adalah eluen yang mampu memisahkan banyak senyawa pada ekstrak dimana masing-masing pemisahan tersebut memiliki jarak yang cukup jauh yang ditampilkan melalui pola kromatogram pada KLT. Dari hasil KLT yang dilakukan, eluen yang dipilih untuk KK adalah diklormetan dan etil asetat dan dilanjutkan dengan eluen etil asetat dan metanol (dengan elusi gradien) karena rentang kepolaran eluen sebelumnya terlalu sempit. Konsentrasi eluen diturunkan 5% tiap 200 mL jika pita warna yang terbentuk tidak turun kembali dan ditampung dengan menggunakan vial kaca berukuran 100 mL.

Kolom kromatografi yang digunakan memiliki tinggi 50 cm dan diameter 5,5 cm. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 yang dikemas dengan cara basah, yaitu dengan mensuspensikan 250 gram silika gel ke diklormetan, yang kemudian dituang ke dalam kolom secara perlahan hingga didapatkan kolom yang kompak. Sampel sejumlah 20,0 gram dimasukkan ke dalam kolom dengan cara kering.

Total fraksi yang diperoleh sejumlah 120 fraksi. Fraksi dengan pola kromatogram yang mirip secara KLT digabung sehingga diperoleh 14 gabungan fraksi dan ditimbang untuk mengetahui rendemen fraksi. Bobot tiap-tiap fraksi dan rendemennya diperlihatkan pada Tabel 4.3. Fraksi-fraksi dengan bobot lebih dari 100 mg akan diuji penghambatannya terhadap aktivitas α -glukosidase dan fraksi yang paling aktif dilakukan identifikasi golongan senyawa kimia (Lampiran 3).

4.4 Uji Pendahuluan Aktivitas α -Glukosidase

Uji pendahuluan aktivitas α -glukosidase perlu dilakukan terlebih dahulu sebelum uji penghambatan α -glukosidase sehingga diketahui kondisi yang sesuai agar enzim bekerja secara optimal. Optimasi yang dilakukan adalah optimasi konsentrasi substrat. Meskipun kerja enzim juga dipengaruhi oleh suhu dan pH, optimasi suhu dan pH tidak dilakukan karena dalam sertifikat analisis α -glukosidase (Lampiran 4) disebutkan bahwa satu unit dari enzim mampu melepaskan 1.0 mikromol D-glukosa dari substrat p-nitrofenil- α -D-glukosida tiap menit pada pH 6,8 dengan suhu 37°C sehingga dapat diketahui bahwa α -glukosidase akan bekerja optimal pada pH 6,8 dan suhu 37°C. Unit enzim yang digunakan pada uji pendahuluan ini adalah 0,05 U/mL, yang dipilih sesuai dengan literatur yang dijadikan acuan. Pengukuran aktivitas enzim tidak perlu dilakukan karena enzim yang digunakan masih baru dan dalam kondisi tersegel sebelum digunakan sehingga diharapkan aktivitas enzim masih baik.

Enzim yang digunakan sebanyak 5,0 mg dengan spesifikasi 15,2 mg solid enzim mengandung 23% protein dan terdapat 215 unit tiap mg protein. Adapun cara perhitungan bobot enzim yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 5. Pengujian efek penghambatan aktivitas terhadap α -glukosidase dilakukan dengan

Universitas Indonesia

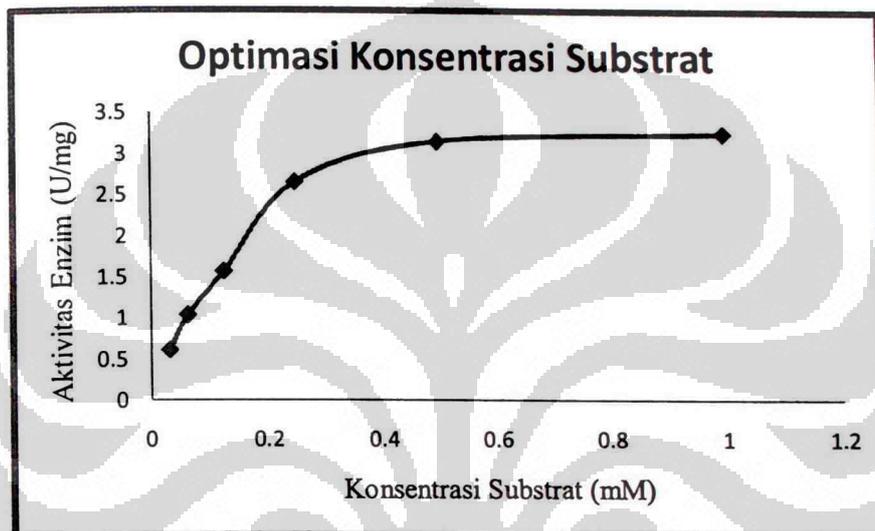
cara mencampurkan sampel dengan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (sertifikat analisis substrat dapat dilihat pada Lampiran 6) dan dapar fosfat pH 6,8 diinkubasi awal pada 37°C selama 5 menit, kemudian ditambahkan larutan α -glukosidase 0,05 U/mL dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan natrium karbonat (Kikkoman, 2011). Produk yang dihasilkan dari reaksi antara α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang memberikan absorbansi maksimum dan baik dengan *microplate reader*, yaitu 405 nm. Pada kontrol blanko dan sampel, natrium karbonat ditambahkan setelah inkubasi awal, substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida dan dapar fosfat (pH 6,8) untuk mengoreksi hasil serapan blanko dan sampel. Setelah diinkubasi selama 30 menit, ditambahkan α -glukosidase pada campuran reaksi tersebut. Hasil yang diperoleh dari kontrol dapat digunakan untuk melihat apakah masih ada produk yang terbentuk pada reaksi antara p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida dan α -glukosidase saat kondisi campuran telah dibasakan terlebih dahulu dengan natrium karbonat dan juga untuk mengoreksi warna ekstrak yang memberikan serapan pada panjang gelombang 405 nm.

Uji optimasi konsentrasi substrat dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi substrat 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 dan 0,03125 mM (lihat pada Tabel 4.4). Variasi konsentrasi yang dipilih mengacu pada variasi konsentrasi substrat yang digunakan pada uji optimasi penelitian sebelumnya yaitu 2; 1,5; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 dan 0,0312 mM. Namun pada uji optimasi ini dilakukan pengurangan konsentrasi substrat (1,5 mM dan 2 mM) karena dianggap pada konsentrasi 1 mM enzim sudah jenuh.

Ketika konsentrasi substrat amat rendah, kecepatan reaksi pun akan amat rendah tetapi kecepatan ini akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat dimana kecepatan ini akan meningkat dengan nilai yang semakin kecil. Akhirnya akan tercapai titik batas, dan setelah titik ini dilampaui, kecepatan reaksi hanya akan bertambah sedemikian kecilnya dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan mendekati tetapi tidak pernah mencapai garis maksimum. Pada batas ini yang disebut kecepatan maksimum (v_{maks}), dimana

enzim menjadi jenuh oleh substratnya, dan tidak dapat berfungsi lebih cepat (Lehninger, 2000) (Gambar 4.2).

Pada penelitian ini, enzim ditafsirkan telah jenuh pada konsentrasi substrat 0,5 mM, dimana konsentrasi tersebut memberikan aktivitas tertinggi sebelum enzim jenuh, yaitu 3,148 U/mg. Dengan demikian, konsentrasi substrat yang digunakan untuk uji penghambatan aktivitas α -glukosidase adalah 0,5 mM.



Gambar 4.2 Grafik optimasi absorbansi dengan variasi konsentrasi substrat 0,0312; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 mM

Pengukuran aktivitas enzim dapat dilakukan dengan memasukan nilai absorbansi yang diperoleh ke dalam persamaan 3.1 dan 3.2. Pada persamaan 3.1, diketahui bahwa 18,3 merupakan ekstensi milimolar p-nitrofenol pada 400 nm, sedangkan pengujian dilakukan pada 405 nm. Perbedaan panjang gelombang ini dapat diabaikan karena puncak pada serapan maksimum p-nitrofenol masih berupa daerah yang melandai pada rentang sekitar 380-405 nm (Lampiran 7). Perhitungan aktivitas enzim dapat dilihat pada Lampiran 8.

4.5 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Pengamatan penghambatan terhadap aktivitas enzim dilakukan dengan membandingkan nilai persen inhibisi dan konsentrasi ekstrak yang dilihat dalam bentuk regresi linier. Persen inhibisi diperoleh dengan membandingkan serapan yang dihasilkan oleh larutan sampel (S) dan larutan blanko (B). Larutan sampel (S_1) adalah larutan uji dengan ekstrak atau fraksi. Larutan blanko (B_1) adalah larutan uji tanpa sampel/ekstrak, namun perlakuannya sama dengan larutan sampel. Masing-masing larutan tersebut dikoreksi dengan kontrol sampel dan kontrol blanko. Kontrol sampel (S_0) memiliki perlakuan yang sama seperti sampel, hanya saja terjadi pertukaran posisi penambahan enzim dan natrium karbonat, dimana sebelum inkubasi yang kedua, natrium karbonat diberikan terlebih dahulu untuk menghentikan reaksi enzimatik. Kontrol blanko (B_0) pun perlakuannya sama dengan kontrol sampel yaitu dengan menukar posisi penambahan enzim dan natrium karbonat, hanya saja dilakukan tanpa sampel. Produk yang dihasilkan dari reaksi antara α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida diukur serapannya pada panjang gelombang 405 nm.

Uji penghambatan aktivitas α -glukosidase dilakukan dengan menggunakan larutan enzim 0,05 U/mL, larutan substrat dengan konsentrasi 0,5 mM. Skema uji penghambatan aktivitas α -glukosidase dapat dilihat pada Lampiran 9. α -Glukosidase yang digunakan berasal dari rekombinan *Saccharomyces cerevisiae* karena relatif lebih murah dibandingkan dengan rekombinan yang lain. Selama preparasi dan pengujian, enzim harus diperlakukan khusus, larutan enzim harus disimpan dalam suhu 2-8°C jika pengujian selesai dalam beberapa minggu (Sigma, 1996). Oleh karena itu, selama preparasi pengujian, larutan enzim diletakkan dalam *ice box* untuk menjaga larutan enzim tetap berada pada suhu rendah. Namun, pada saat akan pengujian, suhu larutan enzim harus dipastikan berada pada suhu 37°C sehingga dilakukan inkubasi kembali setelah penambahan larutan enzim selama 30 menit.

Uji ini dilakukan untuk mengetahui daya hambat ekstrak dan fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom dari ekstrak etil asetat buah ketapang terhadap α -glukosidase dengan melihat nilai IC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi yang dibutuhkan

untuk menghambat 50 % aktivitas enzim. Untuk mendapatkan nilai IC_{50} perlu dilakukan variasi konsentrasi terhadap larutan ekstrak dan fraksi yang akan diuji.

Selain dilakukan pengujian terhadap ekstrak dan fraksi, dilakukan juga pengujian terhadap akarbose sebagai pembanding yang bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak atau fraksi uji tersebut merupakan ekstrak atau fraksi yang aktif menghambat α -glukosidase. Hal itu dapat diketahui dengan cara membandingkan nilai IC_{50} ekstrak dan fraksi uji dengan nilai IC_{50} akarbose. Akarbose dipilih sebagai pembanding karena merupakan agen penghambat α -glukosidase yang telah banyak digunakan dalam pengobatan klinis di Indonesia dan uji penghambatan aktivitas.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa akarbose memiliki efek penghambatan aktivitas α -glukosidase dengan nilai IC_{50} 268,109 ppm (Tabel 4.6). Dilihat dari nilai IC_{50} , akarbose memiliki aktivitas penghambatan yang rendah terhadap α -glukosidase yang berasal dari rekombinan *Saccharomyces cerevisiae*. Akarbose menunjukkan aktivitas penghambatan yang berbeda-beda jika menggunakan sumber enzim yang berbeda-beda pula. Aktivitas penghambatan akarbose peka terhadap enzim yang berasal dari usus tikus, tetapi aktivitas penghambatannya tidak peka terhadap enzim yang berasal dari khamir dan bakteri. Oleh karena itu, sebaiknya digunakan standar yang lain, misalnya 1-*deoxynojirimycin* yang lebih peka terhadap usus tikus, khamir, maupun bakteri (Shinde et al., 2008).

Tabel 4.9 Hasil uji penghambatan aktivitas α -glukosidase ekstrak

Uji	IC_{50} (ppm)
Akarbose (Standar)	268,109
Ekstrak n-Heksana	67,934
Ekstrak Etil Asetat	57,163
Ekstrak Metanol	98,299

Berdasarkan Tabel 4.9, diketahui bahwa ekstrak etil asetat merupakan ekstrak teraktif dengan nilai IC_{50} sebesar 57,163 ppm (Tabel 4.7), sedangkan ekstrak n-heksana memiliki IC_{50} 67,934 ppm (Tabel 4.6) dan ekstrak metanol memiliki IC_{50} 98,299 ppm (Tabel 4.8). Hal ini sesuai dengan penelitian

Universitas Indonesia

sebelumnya yang juga menyatakan demikian. Perhitungan % inhibisi dan IC_{50} akarbose, ekstrak heksan, etil asetat dan metanol secara berturut-turut dapat dilihat pada Lampiran 10-13, sedangkan plot hubungan konsentrasi dan persen inhibisinya dapat dilihat pada Lampiran 14.

Ekstrak etil asetat difraksinasi dan fraksi-fraksi yang diperoleh digabungkan berdasarkan kemiripan hasil kromatogram pada KLT. Fraksi-fraksi gabungan yang bobotnya lebih dari 100 mg diuji kemampuan penghambatan α -glukosidase. Fraksi tersebut dipilih karena fraksi dengan bobot lebih dari 100 mg diharapkan cukup untuk dilakukan penapisan fitokimia yang akan diujikan pada fraksi teraktif.

Tabel 4.14 Hasil uji penghambatan aktivitas α -glukosidase fraksi

Uji	IC_{50} (ppm)
Fraksi D	54,233
Fraksi G	44,243
Fraksi H	67,694
Fraksi L	50,259

Fraksi yang memiliki penghambatan aktivitas α -glukosidase paling tinggi adalah fraksi G dengan nilai IC_{50} 44,243 ppm (Tabel 4.11), sedangkan fraksi D memiliki IC_{50} 54,233 ppm (Tabel 4.10), fraksi H memiliki nilai IC_{50} 67,694 ppm (Tabel 4.12) dan fraksi L memiliki nilai IC_{50} 50,259 ppm (Tabel 4.13). Perhitungan % inhibisi dan IC_{50} fraksi D, G, H dan L secara berturut-turut dapat dilihat pada Lampiran 15-18, sedangkan plot hubungan konsentrasi dan persen inhibisinya dapat dilihat pada Lampiran 19.

Dari hasil pengujian diperoleh bahwa semua ekstrak dan fraksi uji merupakan fraksi aktif apabila dibandingkan dengan akarbose, karena diperoleh nilai IC_{50} semua ekstrak dan fraksi uji lebih rendah dibandingkan dengan akarbose (Tabel 4.14). Hal ini mungkin disebabkan karena ekstrak dan fraksi kasar mengandung beberapa senyawa yang mampu menghambat aktivitas α -glukosidase sehingga menghasilkan efek sinergis (Kim, Nam, Kurihara, & Kim, 2008).

Pengujian efek penghambatan terhadap aktivitas α -glukosidase ini dilakukan dengan metode *spectrophotometric stop rate determination* dengan p-

Universitas Indonesia

nitrofenil- α -D-glukopiranosida sebagai substrat menggunakan *microplate reader*. *Microplate reader* digunakan karena diharapkan dapat menghemat waktu dan bahan yang digunakan. Total volume uji pada tiap sumuran *microplate* adalah 200 μ L, sedangkan jika menggunakan kuvet dapat mencapai 4000 μ L. Dalam sekali pengukuran absorbansi, data serapan yang diperoleh dari *microplate reader* dapat berkisar antara 1 hingga 96 karena total sumuran dari *microplate* adalah 96. Namun, biasanya sumuran hanya digunakan 24-48 dalam sekali pengukuran. Hal ini dilakukan untuk mencegah kerusakan pada larutan enzim karena waktu preparasi pengujian yang terlalu lama.

Pada *microplate reader*, sinar ditransmisikan dari bagian dasar sumuran, yang menyebabkan nilai serapan bergantung pada volume total pengujian. Apabila tiap sumuran memiliki volume total yang berbeda, maka nilai serapan yang dihasilkan juga akan berbeda. Oleh karena itu, pada setiap pengujian dengan menggunakan *microplate reader* diperlukan ketelitian yang tinggi dalam preparasi dan pengujian.

4.6 Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Uji kinetika enzim bertujuan untuk mengetahui jenis penghambatan yang dilakukan oleh sampel terhadap enzim. Jenis penghambatan ini dapat berupa penghambatan kompetitif maupun non kompetitif. Untuk menganalisis kinetika enzim, dapat dilihat hubungan antara satu per konsentrasi substrat ($1/S$) dengan satu per kecepatan reaksi enzim ($1/v$) yang diplot dalam Lineweaver-Burk. Kinetika enzim dapat diketahui dengan melihat kecepatan reaksinya terhadap kenaikan konsentrasi substrat, dimana konsentrasi yang digunakan adalah 0,0625; 0,125; 0,25 dan 0,5 mM.

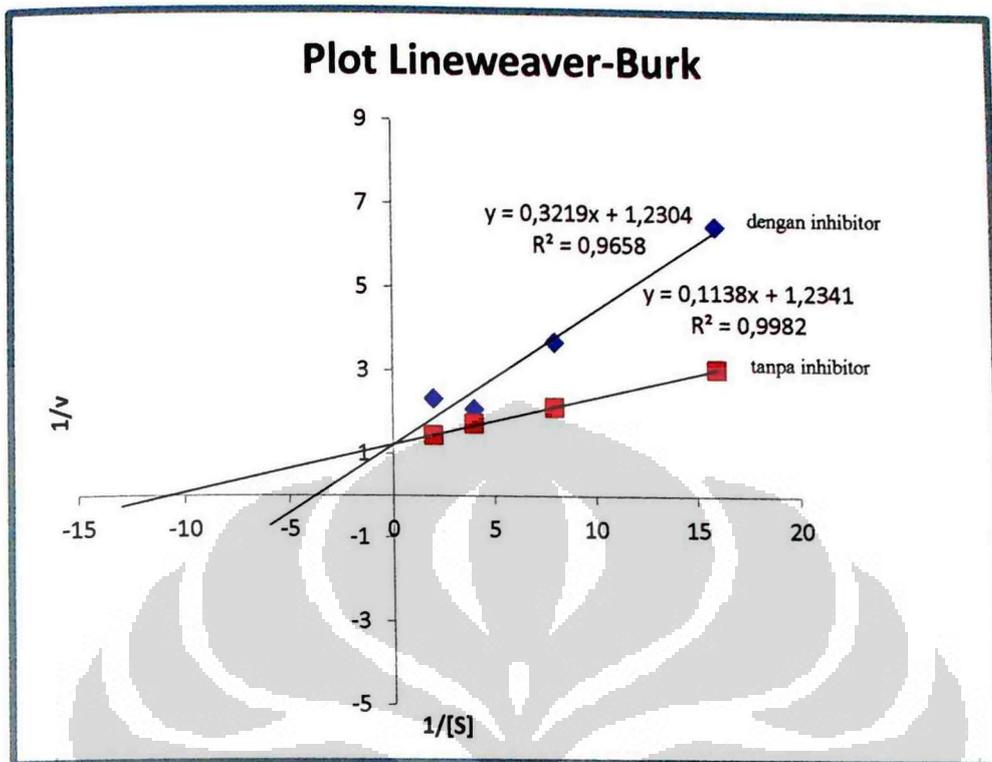
Penghambat yang dipilih adalah fraksi G hasil kromatografi kolom dari ekstrak etil asetat. Hal ini didasarkan karena fraksi G merupakan fraksi yang paling kuat efek penghambatannya terhadap α -glukosidase dibandingkan fraksi uji lain. Data hasil uji kinetika penghambatan aktivitas enzim dapat dilihat pada Tabel 4.15.

Berdasarkan persamaan yang diperoleh, nilai v_{\max} dan K_m dapat ditentukan. Pada sistem tanpa inhibitor diperoleh persamaan $y = 1,234 + 0,113x$

Universitas Indonesia

dengan nilai v_{\max} 0,810 $\mu\text{mol/mL}$ menit dan nilai K_m 0,092 $\mu\text{mol/mL}$. Sedangkan pada sistem dengan inhibitor 50 ppm diperoleh persamaan $y = 1,230 + 0,321x$ dengan nilai v_{\max} 0,813 $\mu\text{mol/mL}$ menit dan nilai K_m 0,261 $\mu\text{mol/mL}$. Hasil ini menunjukkan bahwa v_{\max} pada sistem dengan inhibitor memiliki harga v_{\max} yang mirip dengan sistem tanpa inhibitor dan ada peningkatan nilai K_m . Perhitungan kinetika efek penghambatan aktivitas α -glukosidase fraksi G dapat dilihat pada Lampiran 20 dan hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten dapat dilihat pada Tabel 4.16.

Hasil plot menunjukkan bahwa fraksi etil asetat buah ketapang (*Terminalia catappa* L.) dengan konsentrasi 50 ppm memiliki mekanisme penghambatan kompetitif. Pernyataan tersebut dapat dilihat dari hasil plot Lineweaver-Burk antara sistem tanpa inhibitor dengan sistem dengan inhibitor 50 ppm yang menunjukkan adanya perpotongan kedua persamaan garis di sumbu y (penghambatan kompetitif). Inhibitor yang memiliki mekanisme penghambatan kompetitif memiliki struktur senyawa yang menyerupai substrat atau disebut sebagai analog substrat (Murray, Granner, & Rodwell, 2009). Plot Lineweaver-Burk fraksi etil asetat 50 ppm dengan konsentrasi substrat PNPG 0,0625; 0,125; 0,25 dan 0,5 mM terlihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Plot Lineweaver-Burk fraksi etil asetat 50 ppm dengan konsentrasi substrat PNPG 0,0625; 0,125; 0,25 dan 0,5 mM

4.7 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi Teraktif

Dari hasil uji penghambatan aktivitas α -glukosidase, diketahui bahwa fraksi G etil asetat merupakan fraksi teraktif karena memiliki nilai IC_{50} paling rendah. Kemudian, fraksi tersebut diidentifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis, kecuali identifikasi glikosida (menggunakan pereaksi kimia) untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam fraksi sehingga dapat diduga golongan senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap α -glukosidase. Hasil yang menunjukkan positif mengandung senyawa tertentu dengan KLT kemudian dilakukan identifikasi kembali senyawa tersebut dengan pereaksi kimia untuk memastikan kebenaran golongan senyawa yang terdapat dalam fraksi.

Identifikasi dilakukan menggunakan kontrol positif berupa simplisia atau senyawa yang telah diketahui memiliki kandungan golongan senyawa yang diuji. Kontrol positif tersebut antara lain *Chinae Kortex* untuk kontrol positif golongan

senyawa alkaloid, Caryophylli Flos untuk terpen, Theae Folium untuk tanin, Rhei Radix untuk antrakuinon, Nerii Folium untuk glikosida, dan Liquiritae Radix untuk saponin. Sedangkan untuk golongan senyawa flavonoid digunakan kuersetin sebagai kontrol positif.

Eluen yang digunakan untuk identifikasi adalah n-heksana : etil asetat (7:3), kecuali pada tanin, yaitu dengan eluen butanol : asam asetat glasial : akuades (4:1:5). Lempeng KLT yang digunakan berukuran 7,5 x 2,5 cm dengan jarak elusi sejauh 6,3 cm. Sebelum identifikasi golongan senyawa kimia, fraksi G dielusikan dan disemprot dengan penyemprot asam sulfat 10% terlebih dahulu untuk melihat banyak bercak yang terdapat dalam fraksi (Gambar 4.4). Dari hasil penyemprotan dengan asam sulfat 10% diketahui bahwa fraksi G memiliki 5 bercak.

4.7.1 Alkaloid

Hasil elusi fraksi G yang didapat disemprot dengan penyemprot dragendorf dan tidak menghasilkan bercak, yang menunjukkan bahwa fraksi tidak mengandung senyawa alkaloid (Gambar 4.5).

4.7.2 Flavonoid

Pada pengujian senyawa golongan flavonoid, dilakukan pengujian KLT yang difluoresensi dibawah sinar UV dengan $\lambda = 366$ nm dengan penyemprot $AlCl_3$ 5% dalam etanol. Fluoresensi ekstrak dibandingkan dengan standar kuersetin. Fraksi G mengandung flavonoid karena menghasilkan fluoresensi hijau kuning (Gambar 4.6).

Untuk memastikan kembali kebenaran tersebut, dilakukan pengujian dengan pereaksi kimia, yaitu dengan serbuk asam borat-oksalat. Hasil menunjukan adanya fluoresensi pada fraksi G dan kuersetin ketika dilihat di bawah sinar UV dengan $\lambda = 366$ nm (Gambar 4.12).

4.7.3 Terpen

Hasil positif pada fraksi G ditunjukan oleh adanya bercak ungu ketika lempeng KLT disemprot dengan vanillin dalam asam sulfat dan dipanaskan

Universitas Indonesia

sejenak (Gambar 4.7).

Identifikasi dilanjutkan dengan pereaksi kimia, yaitu dengan pereaksi Lieberman-bouchard. Hasil positif ditunjukkan oleh warna fraksi yang berwarna merah keunguan yang menandakan adanya terpen dalam fraksi G (Gambar 4.13).

4.7.4 Tanin

Dilakukan pengujian KLT dengan penyemprot FeCl_3 1%. Fraksi mengandung tanin apabila bercak berwarna hijau kehitaman. Dari hasil identifikasi fraksi, tidak ditemukan adanya warna hijau kehitaman pada fraksi sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi G tidak mengandung tanin (Gambar 4.8).

4.7.5 Glikon

Glikosida merupakan bagian karbohidrat terbesar yang terdapat dalam tumbuhan, dan bila dihidrolisis akan terurai menjadi glikon dan aglikon. Pada proses identifikasi, gula (glikon) hasil hidrolisis dapat diidentifikasi dengan uji Mollisch. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin warna setelah ditetesi oleh reagen Mollisch dan dituangkan H_2SO_4 pekat melalui dinding. Berdasarkan hasil identifikasi, diperoleh bahwa fraksi G mengandung gula (glikon) (Gambar 4.11).

4.7.6 Saponin

Pada hasil identifikasi KLT dengan penyemprot anisaldehyd dalam asam sulfat dan dipanaskan, ditemukan adanya bercak berwarna ungu yang mungkin menandakan adanya saponin dalam fraksi (Gambar 4.9).

Untuk memastikan hal tersebut, dilakukan identifikasi dengan pereaksi kimia dengan pengocokan. Hasil yang diperoleh adalah tidak terbentuknya buih pada fraksi yang menandakan tidak adanya saponin dalam fraksi G.

4.7.7 Antrakuinon

Berdasarkan hasil pengujian dengan KLT, menunjukkan bahwa fraksi G tidak mengandung kuinon dan antrakuinon. Hal ini ditunjukkan dengan tidak

Universitas Indonesia

terbentuknya bercak berwarna coklat ketika lempeng KLT disemprot dengan penyemprot KOH 8% (Gambar 4.10).

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa dalam fraksi G etil asetat terdapat flavonoid, terpen dan glikosida yang terlihat pada Tabel 4.17.

Tabel 4.17 Hasil Identifikasi Golongan Senyawa

No.	Golongan Senyawa	Fraksi G
1.	Alkaloid	-
2.	Flavonoid	+
3.	Terpen	+
4.	Tanin	-
5.	Glikon	+
6.	Saponin	-
7.	Antrakuinon	-

Keterangan : (+) : Terdeteksi
(-) : Tidak terdeteksi

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

- a. Ekstrak yang memiliki penghambatan aktivitas α -glukosidase tertinggi dari buah ketapang (*Terminalia catappa* L.) adalah ekstrak etil asetat dengan IC_{50} 57,974 ppm dan diikuti oleh ekstrak n-heksana dan metanol yang memiliki nilai IC_{50} 67,934 dan 98,299 ppm. Fraksi teraktif hasil kromatografi kolom dari ekstrak etil asetat buah ketapang adalah fraksi G dengan nilai IC_{50} 44,243 ppm dengan mekanisme penghambatan kompetitif.
- b. Golongan senyawa kimia yang terdapat dalam fraksi G adalah flavonoid, terpen dan glikon.

5.2. Saran

Untuk mendukung data penelitian ini, hendaknya dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan isolasi dan karakterisasi senyawa aktif pada buah ketapang sehingga tanaman tersebut lebih dimungkinkan untuk dikembangkan dalam pengobatan penyakit diabetes melitus.

DAFTAR ACUAN

- Ahmed, S., BM, V., Dhanapal, P., & Chandrashekara, V. (2005). Anti-diabetic activity of *Terminalia catappa* Linn. leaf extracts in alloxan-induced diabetic rats. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 36-39.
- Annegowda, H., Mordi, M., Ramanathan, S., & Mansor, S. (2010). Analgesic and antioxidant properties of ethanolic extract of *Terminalia catappa* L. leaves. *International Journal of Pharmacology*, 910-915.
- Basuki, T., Dewiyanti, I. D., Artanti, N., & Kardono, L. (n.d.). Evaluasi Aktivitas Daya Hambat terhadap Enzim alfa Glukosidase dari Ekstrak Kulit Batang, Daun, Bunga dan Buah Kemuning (*Murraya paniculata* (L.) JACK.).
- Beaglehole, R., & Yach, D. (2003). Globalisation and the prevention and control of non-communicable disease: The neglected chronic disease of adults. *Epidemiology*, 362, 903-908.
- British Pharmacopoeia 2009*. (2008). London: Crown.
- Brunton, L. L., Parker, K. L., Blumenthal, D. K., & Buxton, I. L. (2008). *Goodman & Gilman's : Manual of pharmacology and therapeutic*. United States of America: Mc Graw- Hill Companies.
- Champe, P. C., & Harvey, R. A. (2005). *Lippincott's illustrated reviews: Biochemistry, 3rd Edition*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Choudhary, M.I., *et al.* (2011). Cyclopeptide alkaloids of *Ziziphus oxyphylla* Edgwas novel inhibitors of α -glukosidase enzyme and protein glycation. *Phytochem*, 1-3.
- Chyaua, C.-C., Ko, P.-T., & Mau, J.-L. (2006). Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves. *Food Science and Technolog* , 1099-1108.
- Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. (2007). *Farmakologi dan terapi*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Materia medika Indonesia Jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995a). *Farmakope Indonesia edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Universitas Indonesia

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995b). *Materia medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dipiro, Joseph T., Robert L. Talbert., Gary C. Yee., Gary R. Matzke., Barbara G. Wells., & L. Michael Posey. (2005). *Pharmacotherapy a pathophysiologic approach*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Ebadi, M. (2002). *Pharmacodynamic basis of herbal medicine*. Florida: CRC Press LLC.
- Farnsworth, N. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 255-276.
- Fitriana, K. (2011). *Uji aktivitas antidiabetes dengan metode penghambatan enzim α -glukosidase dan skrining fitokimia pada beberapa tanaman indonesia*. Depok: Universitas Indonesia.
- Gao, et. al. (2004). Hepatoprotective activity of *Terminalia catappa* L. leaves and its two triterpenoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1449-1455.
- Gao, H.-Y., Wu, D., Lu, C., Xu, X. M., Huang, J., Sun, B. H., et al. (2010). Constituent from the testas of *Castanea mollissima* Blume with α -glucosidase inhibitory activity. *Journal of Asian Natural Product Research*, 144-149.
- Gholamhoseinian, A., Fallha, H., Sharifi-far, F., & Mirtajaddini, M. (2008). The inhibitory effect of some iranian plants Extracts on the α -glucosidase. *Iranian Journal of Basic Medicinal Sciences*, 1-9.
- Gritter, R., Bobbit, J., & Schwarting, A. (1985). *Pengantar kromatografi*. Bandung: Penerbit ITB.
- Harborne, J. B. (1987). *Metode fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Bandung: Penerbit ITB.

- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan berguna Indonesia Jilid III*. Jakarta: Badan Litbang Kehutanan Jakarta.
- Hostettmann, K., & Marston, A. (2006). *Preparative chromatography techniques: Applications in natural product isolation*. Berlin: Springer-Verlag.
- Ibegbulem, C. O., Eyong, E. U. & Essien, E. U. (2011). Biochemical effects of drinking *Terminalia catappa* Linn. decoction in Wistar rats. *African Journal of Biochemistry Research*, 237-243.
- Jones, S.B., & Luchsinger, A.E. (1987). *Plant systematics* (2nd ed). New York : McGraw-Hill Companies.
- Kikkoman. (2001). α -Glucosidase (α GLS-SE) from recombinant *E. Coli*, 95-98.
- Kim, K.Y., Nam, K.A., Kurihara, H., & Kim, S.M. (2008). Potent α -Glucosidase Inhibitors Purified from the Red Alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry*, 2820-2825.
- Lehninger, A. L. (2000). *Dasar-dasar biokimia Jilid I diterjemahkan oleh Maggy Thenawidjaja*. Jakarta: Erlangga.
- Lemmens, R., & Soetjipto, N. (1992). *Plant resources of south-east asia 3: Dye and tannin-producing plants*. Bogor: PROSEA.
- Leyama, T., Gunawan-Puteri, M. D., & Kawabata, J. (2011). α - Glukosidase inhibitors from the bulb of *Eleutherine americana*. *Food Chemistry*, 308-311.
- Linn, W.D., Wofford, M.R., O'Keefe, M.E., & Pose, L.M. (2009). *Pharmacotherapy in primary care*. New York: McGraw-Hill, 279-298.
- Matsumoto, K., Takemata, K., Takayama, K., J.M Abesundara, K., Matsui, T., & Katayama, H. (2002). A novel method for the assay of α -glucosidase inhibitory activity using a multi-channel oxygen sensor. *Annalytical Sciences*, 1315-1319.
- McPherson, R. A., & Pinchus, M. R. (2007). *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods* (21th ed.). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Murray, R. K., Granner, D. K., & Rodwell, V. W. (2009). *Harper's illustrated biochemistry* (27th ed). United States of America: McGraw- Hill.

- Nagappa, A., Thakurdesai, P., Raob, N. V., & Singh, J. (2003). Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 45-50.
- Nair, R., & Chanda, S. (2008). Antimicrobial activity of *Terminalia catappa*, *Manilkara zapota* and *Piper betel* leaf extract. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 390-393.
- Samuelsson, G. (1999). *Drugs of natural origin: A textbook of pharmacognosy (4th ed.)*. Swedia: Apotekarsocieteten.
- Shihabudeen, H. M., Pricilla, D. H., & Thirumurugan, K. (2011). Cinnamon Extract Inhibits α -Glukosidase Activity and Dampens Postprandial Glucose Excursion in Diabetic Rats. *Nutrition & Metabolism*, 8-46.
- Shinde, Jayantrao., et al. (2008). α -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) skeels seed kernel in vitro and in goto-kakizaki (GK) rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 65-70.
- Sigma (1996, September 8). *Product Information*. April 15, 2012. <http://www.sigmaaldrich.com/>
- Si, M.-m., et al. (2010). Insulin releasing and alpha-glucosidase inhibitory activity of ethyl acetate fraction of *Acorus calamus* in vitro and in vivo. *Journal of Eihnopharmacology*, 128, 154-159.
- Sofawati, D. (2011). *Uji aktivitas antidiabetes fraksi-fraksi buah ketapang dengan metode penghambatan aktivitas α -glukosidase dan identifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi yang aktif*. Depok: Universitas Indonesia.
- Touchstone, J. C., & Dobbins, M. F. (1983). *Practice of thin layer chromatography 2nd edition*. New York: John Wiley and Sons.
- Ulbricht, C., & Seamon, E. (2010). *Natural standard herbal pharmacotherapy: An evidence-based approach*. St. Louis: Mosby Elsevier.
- United States Pharmacopoeial Convention (30th ed). (2007).
- Wafu, P., Kamdem, R. S., Ali, Z., Anjum, S., Begum, A., Olujemisi, O. S., et al. (2011). Kaurane-type diterpenoids from *Chromoleana odorata*, their x-ray diffraction studies and potent α -glukosidase inhibition of 16-kauren-19-oic acid. *Fitoterapia*, 642-646.

Wagner, H., Blatt, S., & Zgainski, E. (1984). *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*. New York: Springer-Verlag.

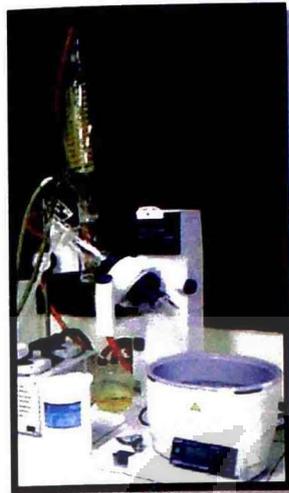
Wild, et. al. (2004). Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Epidemiology*, 1047-1053.

Zakhartsev, M. V., Portner, H. O., & Blusta, R. (2003). Environmentally low-temperature kinetic and thermodynamic study of lactate dehydrogenase from Atlantic cod (*G. morhua*) using a 96-well microplate technique. *Analytical Biochemistry*, 10-20.

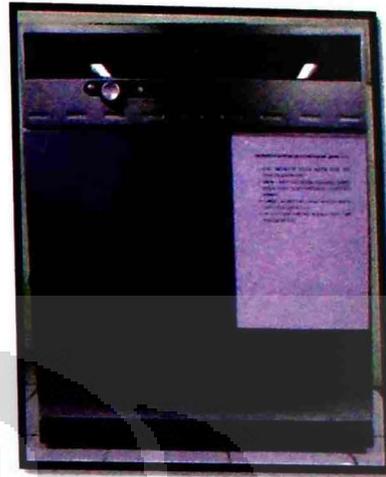


Universitas Indonesia





Gambar 3.1 *Rotary Vacuum Evaporator*



Gambar 3.2 *Inkubator*



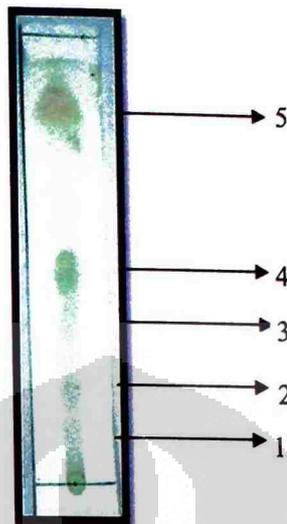
Gambar 3.3 *Multichannel pipette*



Gambar 3.4 *Microplate*

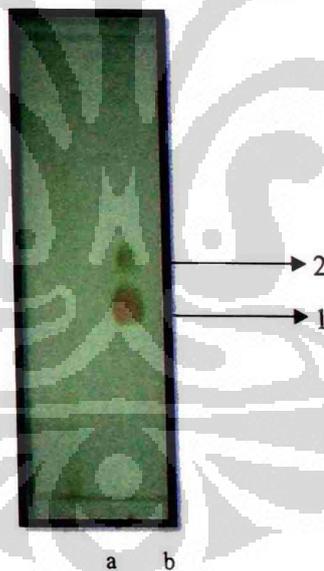


Gambar 3.5 *Microplate reader*



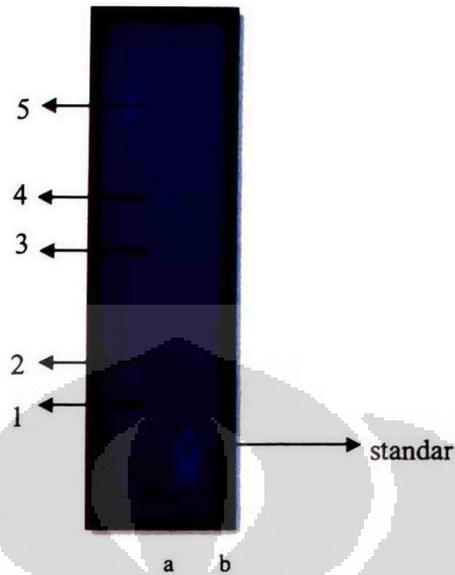
Keterangan: Harga Rf bercak 1) 0,18; 2) 0,22; 3) 0,38; 4) 0,48; 5) 0,84.

Gambar 4.4 Pola kromatogram fraksi G secara visual setelah disemprot larutan asam sulfat 10% dan dipanaskan dengan eluen n-heksana : etil asetat (7:3)



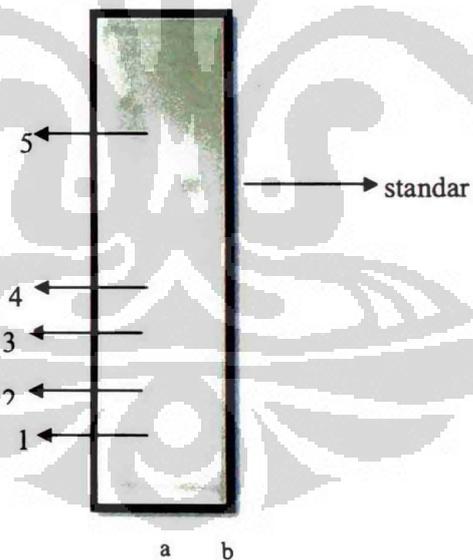
Keterangan: Harga Rf bercak fraksi G: - ; standar: 1) 0,41; 2) 0,49.

Gambar 4.5 Kromatogram alkaloid (a) fraksi G (b) standar (Chinae Kortex) secara visual setelah disemprot larutan dragendorff dengan eluen n-heksana: etil asetat (7:3)



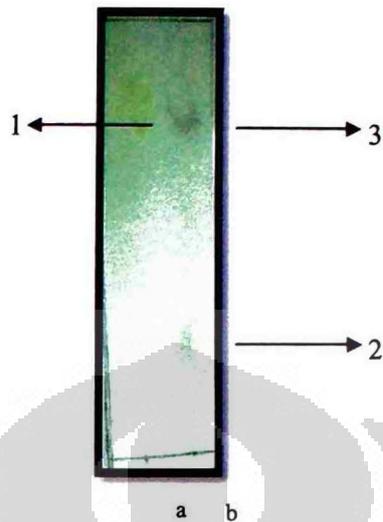
Keterangan: Harga Rf bercak fraksi G: 1) 0,20; 2) 0,25; 3) 0,51; 4) 0,59; 5) 0,80; standar : 0,16.

Gambar 4.6 Kromatogram flavonoid (a) fraksi G (b) standar (kuersetin) [di bawah UV 366 nm] setelah disemprot larutan $AlCl_3$ dengan eluen n-heksana : etil asetat (7 : 3)



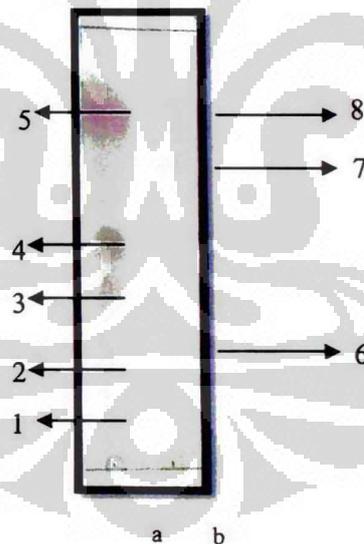
Keterangan: Harga Rf bercak fraksi G: 1) 0,11; 2) 0,20; 3) 0,32; 4) 0,44; 5) 0,75; standar : 0,69.

Gambar 4.7 Kromatogram terpenoid (a) fraksi G (b) standar (Caryophilly Flos) secara visual setelah disemprot larutan vanillin dalam asam sulfat dengan eluen n-heksana : etil asetat (7 : 3)



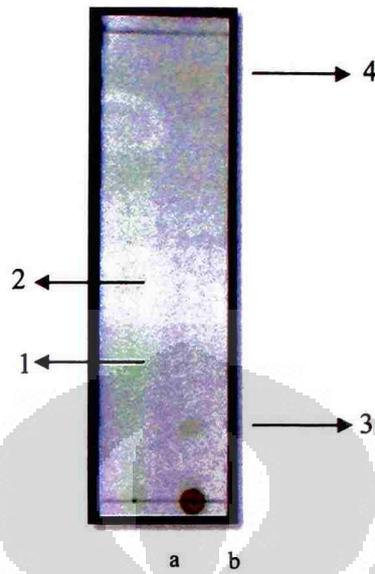
Keterangan: Harga Rf bercak fraksi G 1) 0,76; standar: 2) 0,27; 3) 0,76;

Gambar 4.8 Kromatogram tanin (a) fraksi G (b) standar (*Theae Folium*) secara visual setelah disemprot larutan FeCl_3 dengan eluen butanol : asam asetat glasial : akuades (4:1:5)



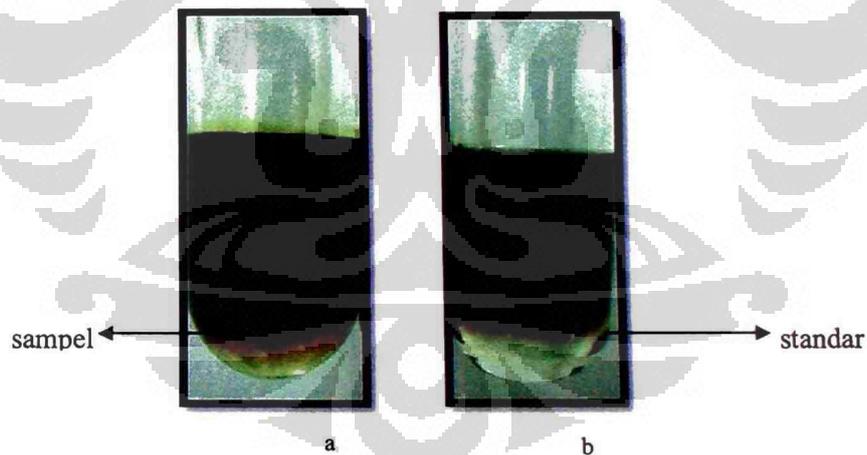
Keterangan: Harga Rf bercak fraksi G: 1) 0,24; 2) 0,15; 3) 0,38; 4) 0,49 5) 0,76; standar: 6) 0,24; 7) 0,68; 8) 0,79;

Gambar 4.9 Kromatogram saponin (a) fraksi G (b) standar (*Liquiritae Radix*) secara visual setelah disemprot larutan anisaldehyd dalam asam sulfat dengan eluen n-heksana : etil asetat (7 : 3)



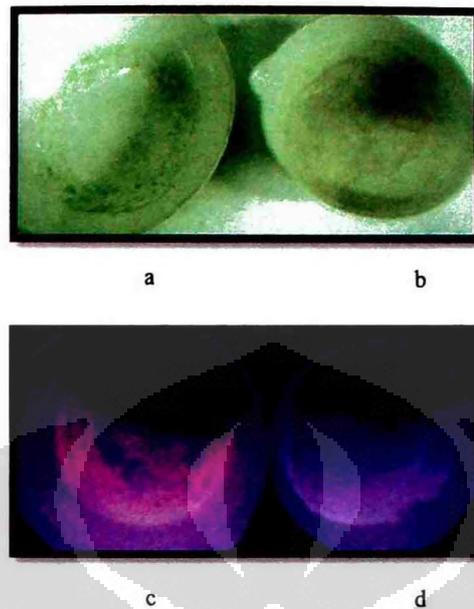
Keterangan: Harga Rf bercak ; fraksi G: 1) 0,27; 2) 0,39; standar: 3) 0,16; 4) 0,86.

Gambar 4.10 Kromatogram antrakuinon (a) fraksi G (b) standar (*Rhei Radix*) secara visual setelah disemprot larutan KOH 8% dengan eluen n-heksana : etil asetat (7 : 3)



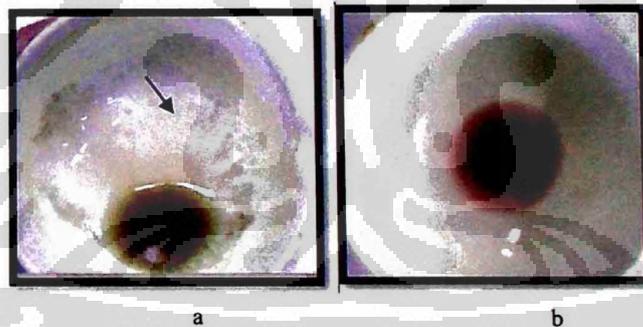
Keterangan: standard dan fraksi G terdapat cincin warna.

Gambar 4.11 Identifikasi glikon (a) fraksi G (b) standar (*Nerii Folium*) dengan pereaksi Mollisch



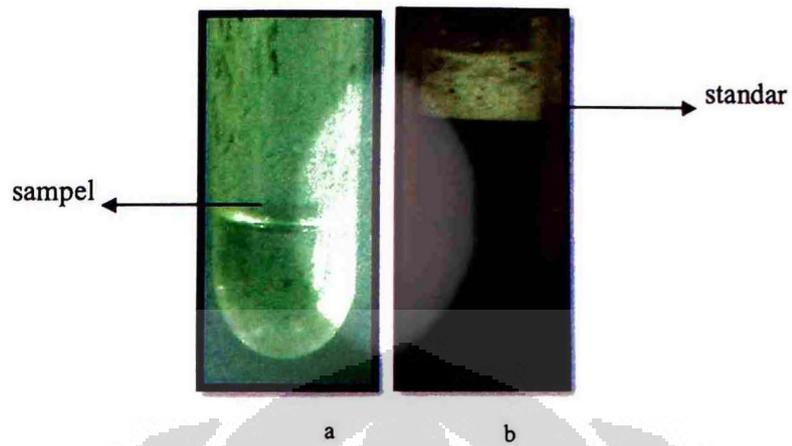
Keterangan: (a) dan (b) secara visual; (c) dan (d) di bawah UV dengan panjang gelombang 366 nm.

Gambar 4.12 Identifikasi flavonoid (a) dan (c) fraksi G (b) dan (d) standar (kuersetin) dengan pereaksi serbuk asam borat-oksalat



Keterangan: larutan uji standard dan fraksi G berwarna ungu.

Gambar 4.13 Identifikasi terpenoid (a) fraksi G (b) standar (Caryophylli Flos) dengan pereaksi Liebermann bouchard



Keterangan: standar: timbul busa; fraksi G tidak timbul busa.

Gambar 4.14 Identifikasi saponin (a) fraksi G (b) standar (Ortosiphon Folium) dengan pengocokan dan penambahan asam klorida



Tabel 4.1 Persentase perbandingan berat buah Ketapang kering terhadap berat buah Ketapang segar

Nama Tanaman Uji	Sebelum dikeringkan (g)	Setelah dikeringkan (g)	Persentase (%)
Buah Ketapang	9476,8	3248,6	65,72%

Tabel 4.2 Rendemen ekstrak buah Ketapang

Nama Ekstrak	Berat Simplisia (g)	Berat Ekstrak Kental (g)	Rendemen Ekstrak (%)
n-Heksana	3248,6	89,9	2,767
Etil Asetat		29,5	0,908
Metanol		71,7	2,207

Tabel 4.3. Rendemen fraksi hasil fraksinasi dengan kromatografi kolom

Nama Fraksi	Berat Sampel (g)	Berat (g)	Rendemen Fraksi (%)
A		0,1172	0,586
B		0,0127	0,064
C		0,0016	0,008
D		0,1468	0,734
E		0,0626	0,313
F		0,0857	0,429
G	20,0	0,7583	3,792
H		0,9332	4,666
I		0,0850	0,425
J		0,0347	0,174
K		0,0376	0,188
L		1,1511	5,756
M		0,913	4,565
N		1,488	7,440

Tabel 4.4. Optimasi aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi substrat

Konsentrasi Substrat		Serapan (A)	U-K	Aktivitas Enzim	
				U/mL	U/mg
0,03125 mM	Uji (U)	0,046	0,042	0,031	0,612
	Kontrol (K)	0,004			
0,0625 mM	Uji (U)	0,071	0,071	0,052	1,035
	Kontrol (K)	0,000			
0,125 mM	Uji (U)	0,118	0,107	0,078	1,567
	Kontrol (K)	0,009			
0,25 mM	Uji (U)	0,182	0,182	0,133	2,652
	Kontrol (K)	0,000			
0,5 mM	Uji (U)	0,226	0,216	0,157	3,148
	Kontrol (K)	0,010			
1 mM	Uji (U)	0,239	0,223	0,162	3,249
	Kontrol (K)	0,016			

Tabel 4.5 Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada Akarbose (Blanko)

Konsentrasi		Serapan (A)	S ₁ - S ₀	% Inhibisi	IC ₅₀
51 ppm	S ₁	0,439	0,415	13,179	
	S ₀	0,024			
76,5 ppm	S ₁	0,406	0,395	17,364	
	S ₀	0,011			
102 ppm	S ₁	0,392	0,384	19,665	268,109
	S ₀	0,008			
153 ppm	S ₁	0,347	0,343	28,243	
	S ₀	0,004			
204 ppm	S ₁	0,289	0,285	40,377	
	S ₀	0,004			
Blanko				0,478	
Persamaan Regresi			y= 0,174x + 3,349		

Tabel 4.6 Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak n-heksana

Konsentrasi		Serapan (A)	$S_1 - S_0$	% Inhibisi	IC_{50}
16,4 ppm	S_1	0,484	0,476	14,079	67,934
	S_0	0,008			
32,8 ppm	S_1	0,447	0,429	22,563	
	S_0	0,018			
41 ppm	S_1	0,376	0,341	38,447	
	S_0	0,035			
82 ppm	S_1	0,280	0,247	55,415	
	S_0	0,033			
123 ppm	S_1	0,610	0,060	89,169	
	S_0	0,550			
Blanko				0,554	
Persamaan Regresi			$y = 0,683x + 3,601$		

Tabel 4.7 Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak etil asetat

Konsentrasi		Serapan (A)	$S_1 - S_0$	% Inhibisi	IC_{50}
10,1 ppm	S_1	0,867	0,756	11,268	57,163
	S_0	0,111			
25,25 ppm	S_1	0,807	0,649	23,826	
	S_0	0,158			
50,5 ppm	S_1	0,656	0,473	44,484	
	S_0	0,183			
75,75 ppm	S_1	0,539	0,296	65,258	
	S_0	0,243			
101 ppm	S_1	1,088	0,119	86,033	
	S_0	0,969			
Blanko				0,852	
Persamaan Regresi			$y = 0,822x + 3,012$		

Tabel 4.8 Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak metanol

Konsentrasi		Serapan (A)	S ₁ - S ₀	% Inhibisi	IC ₅₀
28,7 ppm	S ₁	0,416	0,398	29,118	98,299
	S ₀	0,018			
57,4 ppm	S ₁	0,367	0,330	41,229	
	S ₀	0,037			
86,1 ppm	S ₁	0,371	0,309	44,969	
	S ₀	0,062			
114,8 ppm	S ₁	0,528	0,270	51,915	
	S ₀	0,258			
172,2 ppm	S ₁	0,519	0,148	73,642	
	S ₀	0,371			
Blanko				0,562	
Persamaan Regresi			y = 0,294x + 21,10		

Tabel 4.10 Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi D

Konsentrasi		Serapan (A)	S ₁ - S ₀	% Inhibisi	IC ₅₀
25 ppm	S ₁	0,451	0,326	38,082	54,233
	S ₀	0,125			
50 ppm	S ₁	0,477	0,300	43,019	
	S ₀	0,177			
75 ppm	S ₁	0,450	0,207	60,684	
	S ₀	0,243			
100 ppm	S ₁	0,456	0,128	75,689	
	S ₀	0,328			
150 ppm	S ₁	0,543	0,056	92,265	
	S ₀	0,487			
Blanko				0,527	
Persamaan Regresi			y = 0,463x + 24,89		

Tabel 4.11 Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi G

Konsentrasi		Serapan (A)	S ₁ - S ₀	% Inhibisi	IC ₅₀
25 ppm	S ₁	0,395	0,363	34,653	44,243
	S ₀	0,032			
50 ppm	S ₁	0,309	0,251	54,815	
	S ₀	0,058			
75 ppm	S ₁	0,255	0,179	67,777	
	S ₀	0,076			
100 ppm	S ₁	0,238	0,084	84,878	
	S ₀	0,154			
150 ppm	S ₁	0,232	0,017	97,652	
	S ₀	0,215			
Blanko				0,555	
Persamaan Regresi			$y = 0,502x + 27,79$		

Tabel 4.12 Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi H

Konsentrasi		Serapan (A)	S ₁ - S ₀	% Inhibisi	IC ₅₀
25 ppm	S ₁	0,475	0,443	17,351	67,694
	S ₀	0,032			
50 ppm	S ₁	0,370	0,308	42,537	
	S ₀	0,062			
75 ppm	S ₁	0,319	0,237	55,783	
	S ₀	0,082			
100 ppm	S ₁	0,226	0,124	76,866	
	S ₀	0,102			
150 ppm	S ₁	0,211	0,052	95,580	
	S ₀	0,179			
Blanko				0,555	
Persamaan Regresi			$y = 0,618x + 8,165$		

Tabel 4.13 Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi L

Konsentrasi		Serapan (A)	$S_1 - S_0$	% Inhibisi	IC_{50}
25 ppm	S_1	0,421	0,374	29,567	50,259
	S_0	0,047			
50 ppm	S_1	0,369	0,266	49,906	
	S_0	0,103			
75 ppm	S_1	0,332	0,157	70,433	
	S_0	0,175			
100 ppm	S_1	0,294	0,089	83,239	
	S_0	0,089			
150 ppm	S_1	0,357	0,019	97,376	
	S_0	0,338			
Blanko				0,531	
Persamaan Regresi			$y = 0,541x + 22,81$		

Keterangan: S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol Sampel; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.15. Hasil uji kinetika penghambatan aktivitas enzim fraksi teraktif (Fraksi G)

Konsentrasi Substrat [S]	Serapan (v)		1/[Substrat]	1/[v ₀]	1/[v ₁]
	v ₀	v ₁			
0,5 mM	0,578	0,431	2	1,730	2,320
0,25 mM	0,471	0,482	4	2,123	2,075
0,125 mM	0,327	0,271	8	3,058	3,690
0,0625 mM	0,216	0,154	16	4,629	6,494

Keterangan : v₀ = Tanpa inhibitor; v₁ = inhibitor 50 ppm

Tabel 4.16 Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten fraksi G dengan konsentrasi 50 ppm

	a	b	v _{max}	K _m
Tanpa inhibitor	1,234	0,113	0,810	0,092
Inhibitor 50 ppm	1,230	0,321	0,813	0,261

A large, light gray watermark of a stylized floral or geometric pattern is centered on the page. The pattern is symmetrical and resembles a traditional Indonesian motif. The word "LAMPIRAN" is superimposed over the center of this watermark.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Determinasi Buah Ketapang



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)
 Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
 Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 12 April 2012

Nomor : 564/IPH.1.02/If.8/IV/2012
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/ determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Devin Ayu Putri Dewa
 Npm : 0806327736
 Mhs. Univ. Indonesia
 Fakultas Farmasi
 Kampus UI Depok, 16424

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Ketapang	<i>Terminalia catappa</i> L.	Combretaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

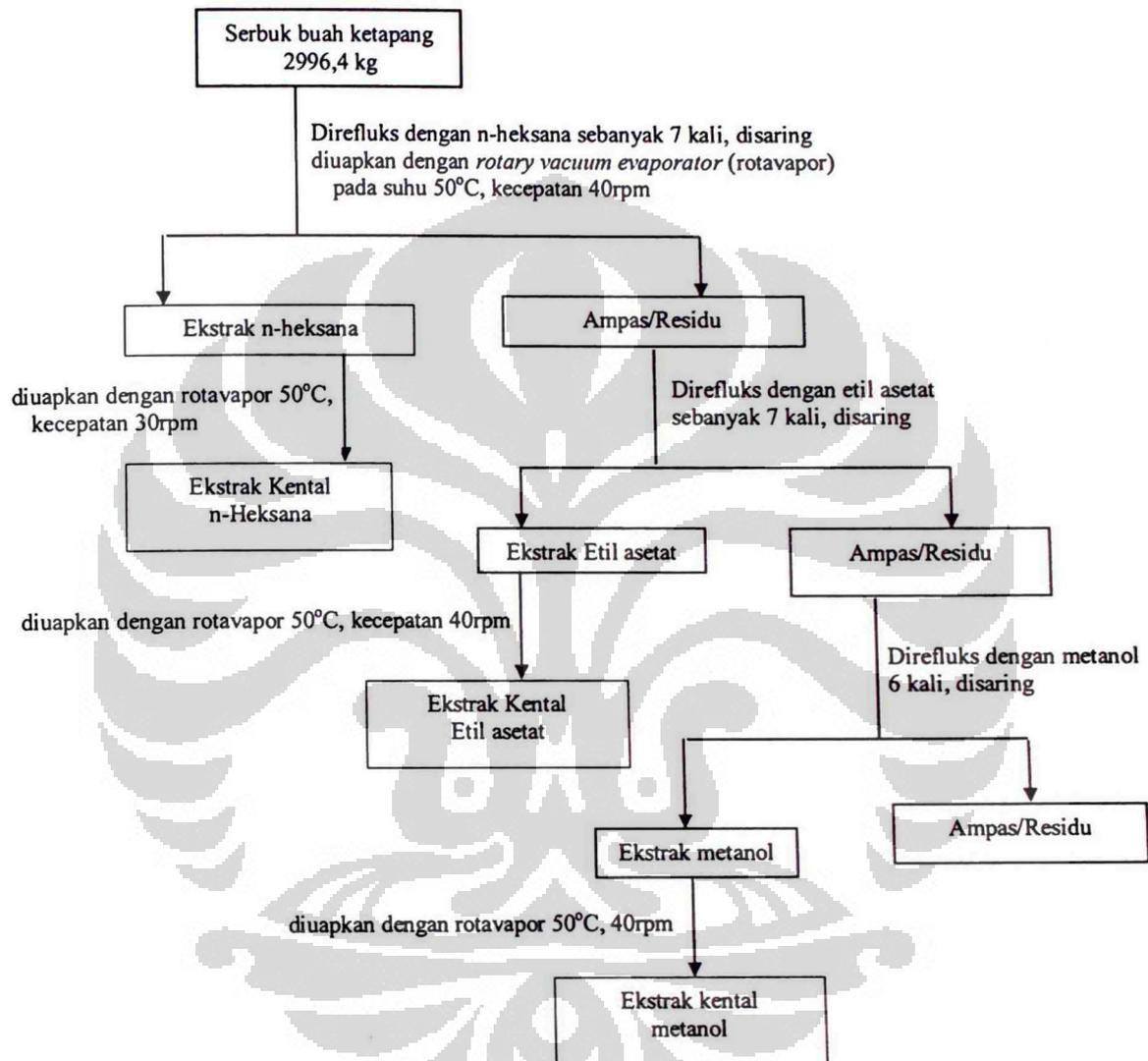


Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,
Dr. Joeni Setijoe Rahajoe
 NIP. 196706241993032004

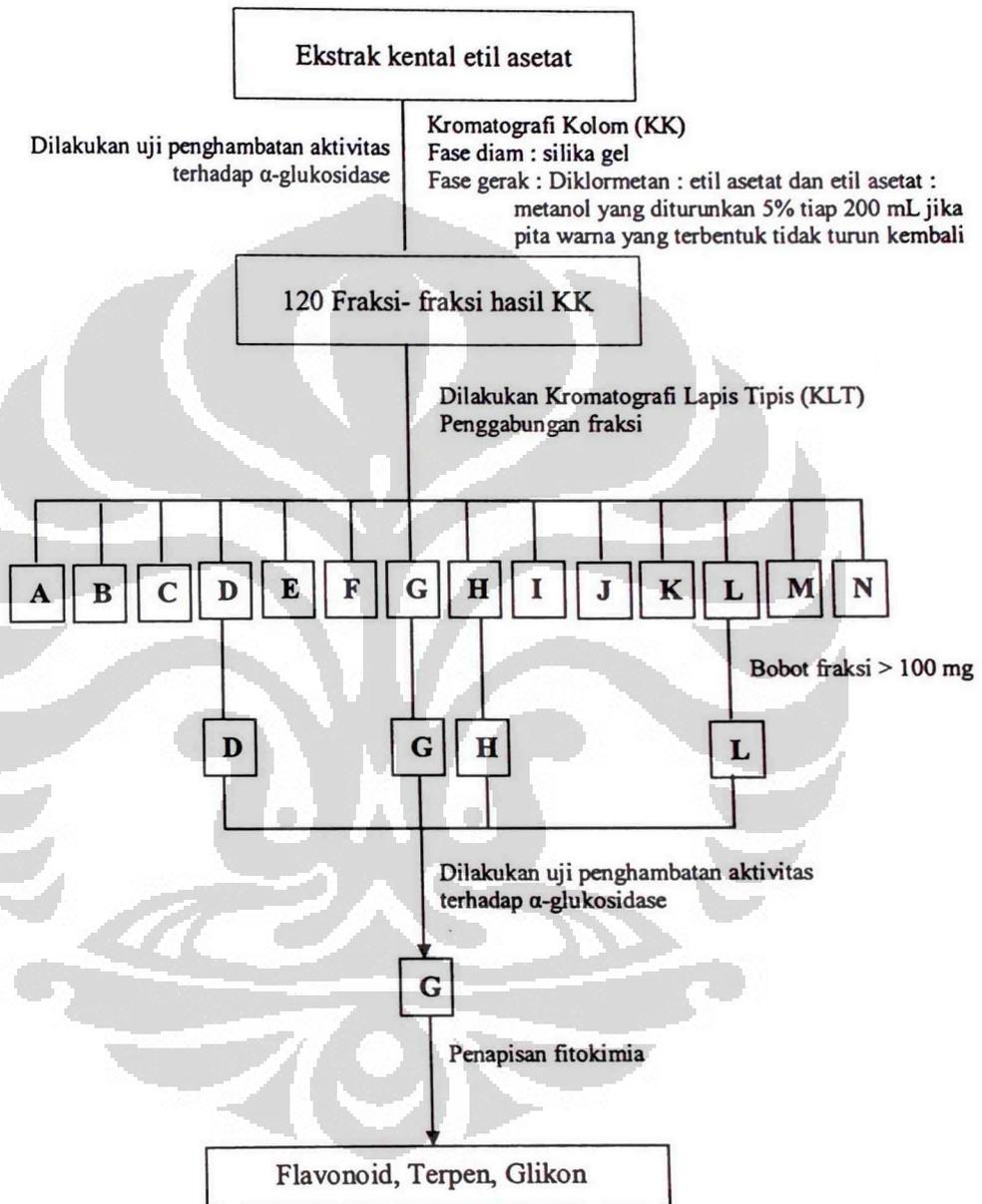
D:\Ident 2012\Devin Ayu Putri Dewa.doc\Wardi-DG

Page 1 of 1

Lampiran 2. Skema Ekstraksi Bertingkat Buah Ketapang (*Terminalia catappa* L.)



Lampiran 3. Fraksinasi Ekstrak Etil Asetat dan Identifikasi Golongan Senyawa yang Memiliki Penghambatan terhadap Aktivitas α -Glukosidase



Lampiran 4. Sertifikat Analisis α -Glukosidase

SIGMA-ALDRICH sigmaaldrich.com

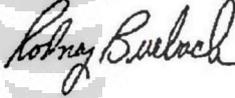
3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sigmaaldrich.com
 Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Certificate of Analysis

Product Name: α -Glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* - recombinant, expressed in unspecified host, lyophilized powder, ≥ 125 units/mg protein

Product Number: G0660
 Lot Number: SLBB4081V
 Brand: SIGMA
 CAS Number: 9001-42-7
 MDL Number: MFCD00031321
 Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
 Quality Release Date: 04 JAN 2012
 Recommended Retest Date: JAN 2016

Test	Specification	Result
% Protein (Biuret)	> 10	23
units/mg protein	≥ 125	215
One unit will liberate 1.0 micromole of D-Glucose from P-Nitrophenyl Alpha-D-Glucoside per minute at pH 6.8 at 37 deg C.		
units/mg protein	≥ 50	120
One unit will convert 1.0 micromole of Maltose to 2.0 micromoles of D-Glucose per minute at pH 6.0 at 25 deg C.		
Recommended Retest Period 4 years		


 Rodney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1 Page 1 of 1

Lampiran 5. Cara Perhitungan Bobot α -Glukosidase yang Ditimbang
Label yang terdapat pada kemasan α -glukosidase adalah 15,2 mg solid; 23 % protein; 215 Unit/mg protein.

$$\text{Jumlah protein} = \frac{23}{100} \times 15,2 \text{ mg solid} = 3,496 \text{ mg protein}$$

Dalam 15,2 mg solid mengandung 3,496 mg protein

$$215 \frac{\text{U}}{\text{mg protein}} \rightarrow 751,64 \frac{\text{U}}{3,496 \text{ mg protein}}$$

Akan dibuat larutan induk 2,5 U/mL:

$$\text{Larutan induk} = 2,5 \frac{\text{U}}{\text{mL}} = \frac{250 \text{ U}}{100 \text{ mL}}$$

Sehingga perlu ditimbang:

$$\frac{250 \text{ U}}{751,64 \text{ U}} \times 15,2 \text{ mg solid} = 5,056 \text{ mg solid}$$

Pengenceran larutan α -glukosidase:

diambil 2,0 ml larutan enzim dan dilarutkan dengan dapar fosfat pH (6,8) hingga volume 100,0 mL

$$\frac{2,0 \text{ mL}}{100,0 \text{ mL}} \times 2,5 \frac{\text{U}}{\text{mL}} = 0,05 \frac{\text{U}}{\text{mL}}$$

Jadi didapatkan larutan α -glukosidase dengan konsentrasi $0,05 \frac{\text{U}}{\text{mL}}$ sebanyak 100,0 mL

Lampiran 6. Sertifikat Analisis p-Nitrofenil- α -D-glukopiranosida

SIGMA-ALDRICH		SIGMA	
		Industrieszasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland Tel. +41 81 755 2511 Fax: +41 81 756 5449	
Certificate of Analysis			
Product Name:	4-NITROPHENYL α -D-GLUCOPYRANOSIDE		
	>= 99 %		
Product Number:	N1377		
Product Brand:	Sigma		
Molecular Formula:	$C_{12}H_{13}NO_5$		
Molecular Mass:	301.25		
CAS Number:	3767-28-0		
TEST	SPECIFICATION	LOT BCBG2931V RESULTS	
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF-WHITE	WHITE	
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER	
PURITY (TLC AREA %)	≥ 99 %	99.0 %	
SPECIFIC ROTATION (20/D)	210 - 220 DEGREES	210.1 DEGREES	
CONCENTRATION	C=1 IN WATER	C=1 IN WATER	
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS TO YELLOW-GREEN	VERY FAINT YELLOW-GREEN	
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR TO VERY SLIGHTLY HAZY	CLEAR	
SOLUBILITY (METHOD)	20 MG/ML IN METHANOL	20 MG/ML IN METHANOL	
QC RELEASE DATE	09/AUG/11		
RECOMMENDED RETEST DATE	JUL/16		
 Dr. Claudia Geitner Manager Quality Control Buchs, Switzerland			
Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.			
Sigma-Aldrich	Certificate of Analysis - Product N1377 Lot BCBG2931V	Page 1 of 1	

Lampiran 7. Spektrum Serapan p-Nitrofenol pada Panjang Gelombang 400 nm



Lampiran 8. Perhitungan Aktivitas Enzim pada Berbagai Konsentrasi Substrat

Diketahui: $V = 0,2 \text{ mL}$; $df = 50$; $V_e = 0,025 \text{ mL}$; $t = 30 \text{ menit}$; $C = 0,05$

Pada konsentrasi $0,03125 \text{ mM}$

$$\text{Unit/mL enzim} = \frac{0,042 \times 0,2 \times 50}{18,3 \times 0,025 \times 30} = 0,031 \text{ U/mL}$$

$$\text{Unit/mg enzim} = 0,031 \text{ U/mL enzim} \times \frac{1}{0,05} = 0,612 \text{ U/mg}$$

Pada konsentrasi $0,0625 \text{ mM}$

$$\text{Unit/mL enzim} = \frac{0,071 \times 0,2 \times 50}{18,3 \times 0,025 \times 30} = 0,052 \text{ U/mL}$$

$$\text{Unit/mg enzim} = 0,052 \text{ U/mL enzim} \times \frac{1}{0,05} = 1,035 \text{ U/mg}$$

Pada konsentrasi $0,125 \text{ mM}$

$$\text{Unit/mL enzim} = \frac{0,107 \times 0,2 \times 50}{18,3 \times 0,025 \times 30} = 0,078 \text{ U/mL}$$

$$\text{Unit/mg enzim} = 0,078 \text{ U/mL enzim} \times \frac{1}{0,05} = 1,567 \text{ U/mg}$$

Pada konsentrasi $0,25 \text{ mM}$

$$\text{Unit/mL enzim} = \frac{0,182 \times 0,2 \times 50}{18,3 \times 0,025 \times 30} = 0,133 \text{ U/mL}$$

$$\text{Unit/mg enzim} = 0,133 \text{ U/mL enzim} \times \frac{1}{0,05} = 2,652 \text{ U/mg}$$

Pada konsentrasi $0,5 \text{ mM}$

$$\text{Unit/mL enzim} = \frac{0,216 \times 0,2 \times 50}{18,3 \times 0,025 \times 30} = 0,157 \text{ U/mL}$$

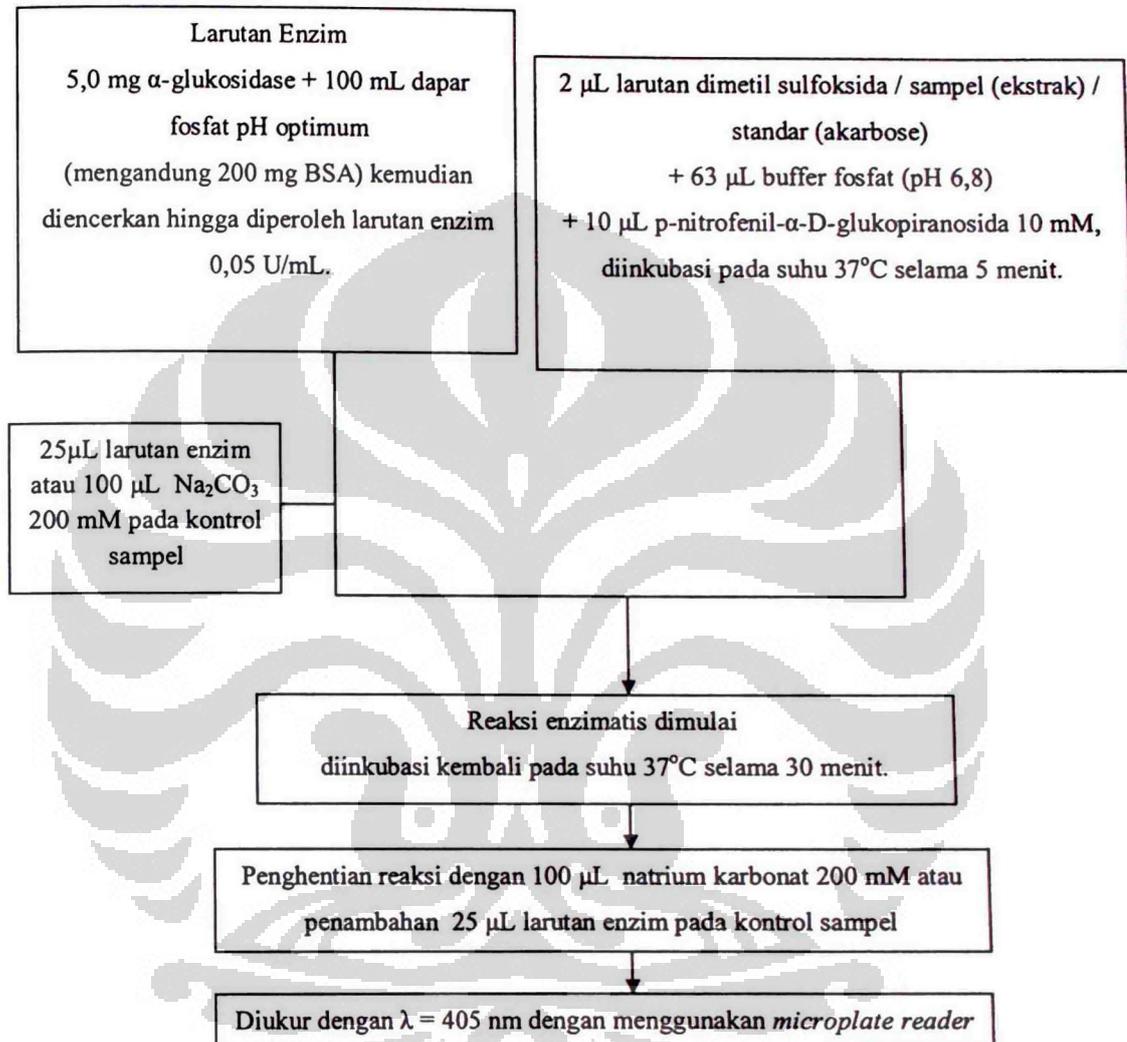
$$\text{Unit/mg enzim} = 0,157 \text{ U/mL enzim} \times \frac{1}{0,05} = 3,148 \text{ U/mg}$$

Pada konsentrasi 1 mM

$$\text{Unit/mL enzim} = \frac{0,223 \times 0,2 \times 50}{18,3 \times 0,025 \times 30} = 0,162 \text{ U/mL}$$

$$\text{Unit/mg enzim} = 0,162 \text{ U/mL enzim} \times \frac{1}{0,05} = 3,249 \text{ U/mg}$$

Lampiran 9. Skema Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase



Lampiran 10. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ Akarbose

Diketahui blanko : 0,478

Pada konsentrasi 51 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,478 - 0,419}{0,478} \times 100\% = 13,179 \%$$

Pada konsentrasi 76,5 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,478 - 0,395}{0,478} \times 100\% = 17,364 \%$$

Pada konsentrasi 102 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,478 - 0,384}{0,478} \times 100\% = 19,665 \%$$

Pada konsentrasi 153 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,478 - 0,343}{0,478} \times 100\% = 28,243 \%$$

Pada konsentrasi 204 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,478 - 0,285}{0,478} \times 100\% = 40,377 \%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 3,349 + 0,174x$$

dimana,

$$a = 3,349$$

$$b = 0,174$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 3,349}{0,174} = 268,109 \text{ ppm}$$

Lampiran 11. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ Ekstrak n-Heksana

Diketahui blanko : 0,554

Pada konsentrasi 16,4 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,554 - 0,476}{0,554} \times 100\% = 14,079 \%$$

Pada konsentrasi 32,8 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,554 - 0,429}{0,554} \times 100\% = 22,563 \%$$

Pada konsentrasi 41 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,554 - 0,341}{0,554} \times 100\% = 38,447 \%$$

Pada konsentrasi 82 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,478 - 0,247}{0,478} \times 100\% = 55,415 \%$$

Pada konsentrasi 123 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,478 - 0,060}{0,478} \times 100\% = 89,169 \%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 3,601 + 0,683x$$

dimana,

$$a = 3,601$$

$$b = 0,683$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 3,601}{0,683} = 67,934 \text{ ppm}$$

Lampiran 12. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ Ekstrak Etil Asetat

Diketahui blanko : 0,852

Pada konsentrasi 10,1 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,852 - 0,756}{0,852} \times 100\% = 11,268 \%$$

Pada konsentrasi 25,25 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,852 - 0,649}{0,852} \times 100\% = 23,826 \%$$

Pada konsentrasi 50,5 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,852 - 0,473}{0,852} \times 100\% = 44,484 \%$$

Pada konsentrasi 75,75 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,852 - 0,296}{0,852} \times 100\% = 65,258 \%$$

Pada konsentrasi 101 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,852 - 0,119}{0,852} \times 100\% = 86,033 \%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 3,012 + 0,822x$$

dimana,

$$a = 3,012$$

$$b = 0,822$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 3,012}{0,822} = 57,163 \text{ ppm}$$

Lampiran 13. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ Ekstrak Metanol

Diketahui blanko : 0,562

Pada konsentrasi 28,7 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,562 - 0,398}{0,562} \times 100\% = 29,118 \%$$

Pada konsentrasi 57,4 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,562 - 0,330}{0,562} \times 100\% = 41,229 \%$$

Pada konsentrasi 86,1 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,852 - 0,309}{0,852} \times 100\% = 44,969 \%$$

Pada konsentrasi 114,8 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,852 - 0,270}{0,852} \times 100\% = 51,915 \%$$

Pada konsentrasi 172,2 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,852 - 0,148}{0,852} \times 100\% = 73,642 \%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 21,10 + 0,294x$$

dimana,

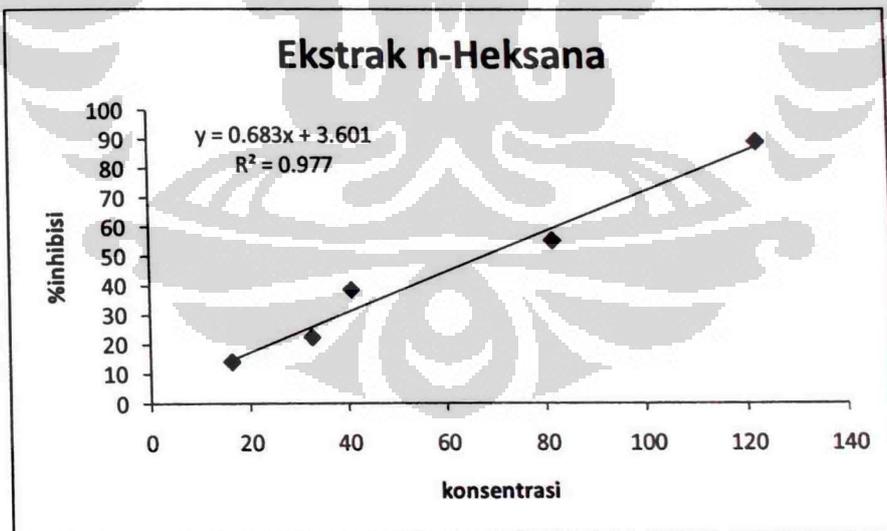
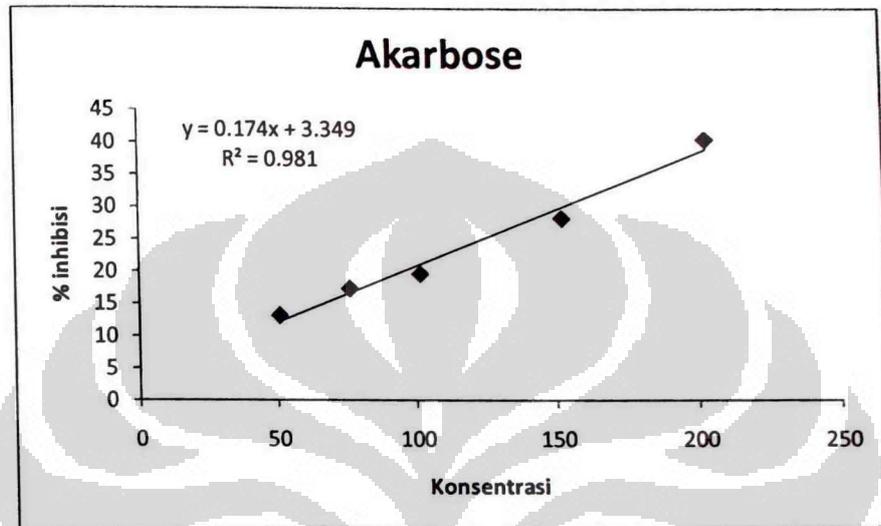
$$a = 21,10$$

$$b = 0,294$$

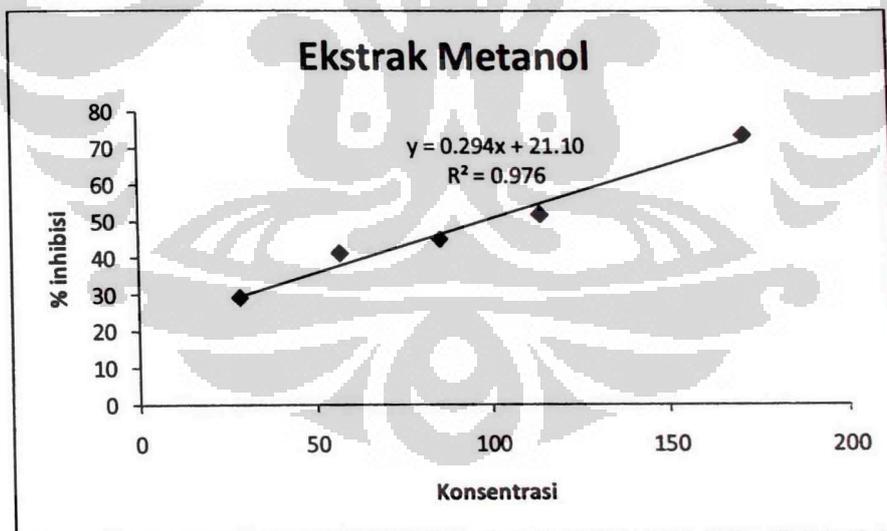
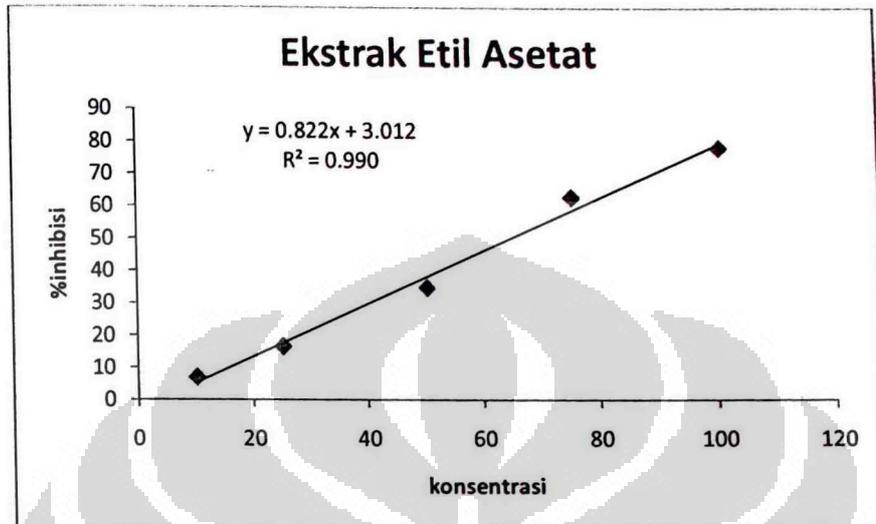
sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 21,10}{0,294} = 98,299 \text{ ppm}$$

Lampiran 14. Plot Hubungan Konsentrasi dan Persen Inhibisi Akarbose dan tiap Ekstrak



(lanjutan)



Lampiran 15. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ Fraksi D

Diketahui blanko : 0,527

Pada konsentrasi 25 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,527 - 0,326}{0,527} \times 100\% = 38,082 \%$$

Pada konsentrasi 50 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,527 - 0,300}{0,527} \times 100\% = 43,019 \%$$

Pada konsentrasi 75 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,527 - 0,207}{0,527} \times 100\% = 60,684 \%$$

Pada konsentrasi 100 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,527 - 128}{0,527} \times 100\% = 60,684 \%$$

Pada konsentrasi 150 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,852 - 0,1056}{0,852} \times 100\% = 92,265 \%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 24,89 + 0,463x$$

dimana,

$$a = 24,89$$

$$b = 0,463$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 24,89}{0,463} = 54,233 \text{ ppm}$$

Lampiran 16. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ Fraksi G

Diketahui blanko : 0,555

Pada konsentrasi 25 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,555 - 0,373}{0,555} \times 100\% = 34,653 \%$$

Pada konsentrasi 50 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,555 - 0,251}{0,555} \times 100\% = 54,815 \%$$

Pada konsentrasi 75 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,555 - 0,179}{0,555} \times 100\% = 67,777 \%$$

Pada konsentrasi 100 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,555 - 0,084}{0,555} \times 100\% = 84,878 \%$$

Pada konsentrasi 150 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,555 - 0,017}{0,555} \times 100\% = 97,652 \%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 27,79 + 0,502x$$

dimana,

$$a = 27,79$$

$$b = 0,502$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 27,79}{0,502} = 44,243 \text{ ppm}$$

Lampiran 17. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ Fraksi H

Diketahui blanko : 0,555

Pada konsentrasi 25 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,555 - 0,443}{0,555} \times 100\% = 17,351 \%$$

Pada konsentrasi 50 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,555 - 0,308}{0,555} \times 100\% = 42,537 \%$$

Pada konsentrasi 75 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,555 - 0,237}{0,555} \times 100\% = 55,783 \%$$

Pada konsentrasi 100 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,555 - 0,124}{0,555} \times 100\% = 76,866 \%$$

Pada konsentrasi 150 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,555 - 0,052}{0,555} \times 100\% = 95,580 \%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 8,165 + 0,618x$$

dimana,

$$a = 8,165$$

$$b = 0,618$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 8,165}{0,618} = 67,694 \text{ ppm}$$

Lampiran 18. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ Fraksi L

Diketahui blanko : 0,531

Pada konsentrasi 25 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,531 - 0,374}{0,531} \times 100\% = 29,567 \%$$

Pada konsentrasi 50 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,531 - 0,266}{0,531} \times 100\% = 49,906 \%$$

Pada konsentrasi 75 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,531 - 0,157}{0,531} \times 100\% = 70,433 \%$$

Pada konsentrasi 100 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,555 - 0,089}{0,555} \times 100\% = 83,239 \%$$

Pada konsentrasi 150 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,555 - 0,019}{0,555} \times 100\% = 97,376 \%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 22,81 + 0,541x$$

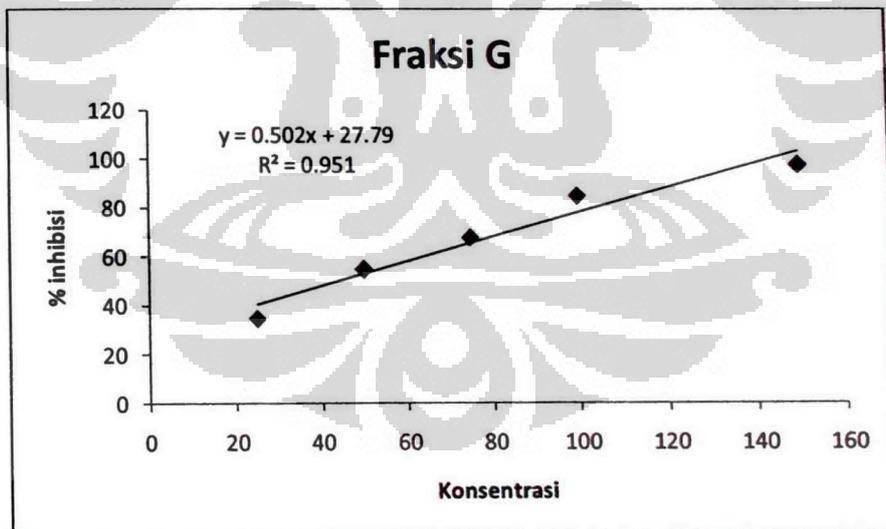
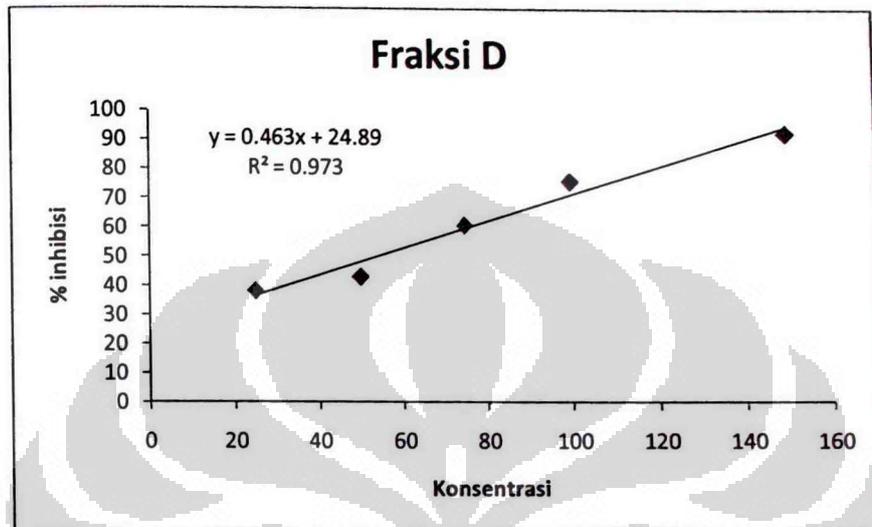
dimana,

$$a = 22,81$$

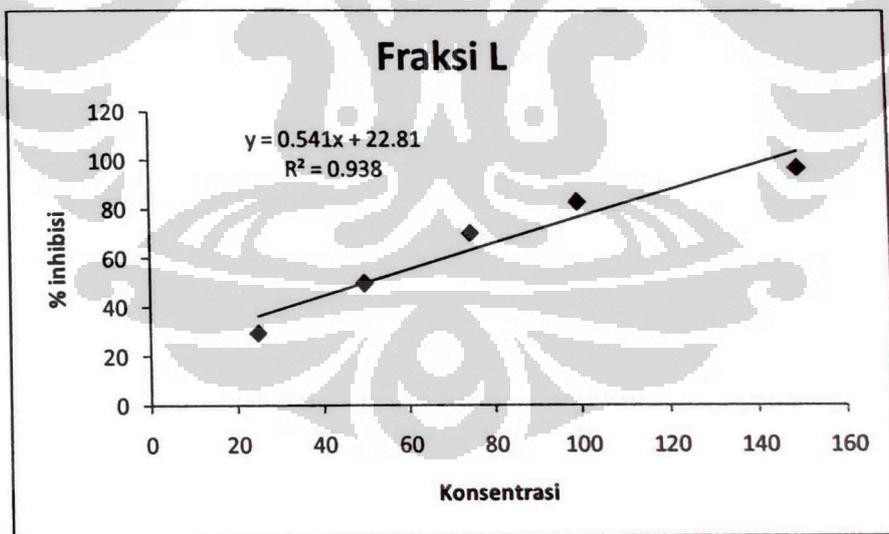
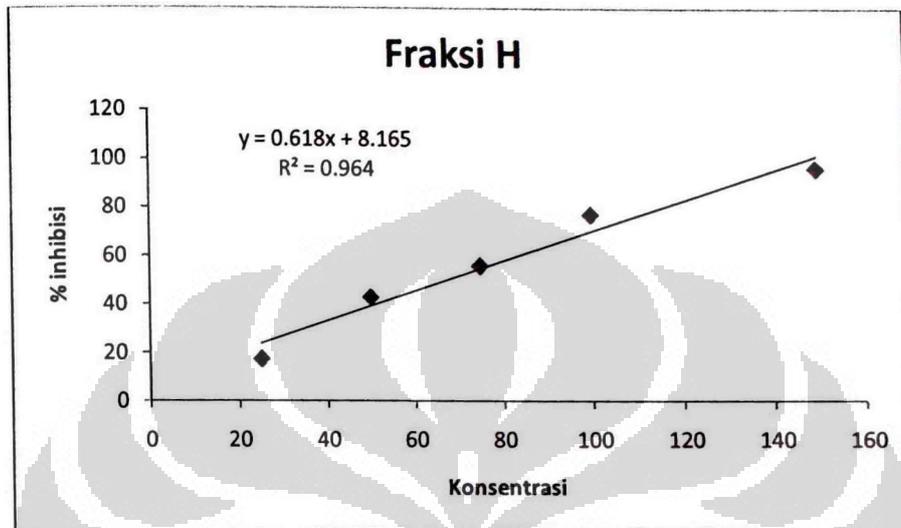
$$b = 0,541$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 22,81}{0,541} = 50,259 \text{ ppm}$$

Lampiran 19. Plot Hubungan Konsentrasi dan Persen Inhibisi tiap Fraksi

(lanjutan)



Universitas Indonesia

Lampiran 20. Perhitungan Kinetika Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Fraksi Teraktif (Fraksi G)

Berdasarkan Tabel 4.16 diperoleh regresi linier: $y = a + bx$

Tanpa inhibitor: $y = 1,234 + 0,113x$

dimana: $a = 1,234$ dan $b = 0,113$

Dengan inhibitor: $y = 1,230 + 0,321x$

dimana: $a = 1,230$ dan $b = 0,321$

sehingga didapatkan

$$v_{\text{maks}} = \frac{1}{a}$$

v_{maks} (tanpa inhibitor) = $0,810 \mu\text{mol/mL menit}$

v_{maks} (dengan inhibitor) = $0,813 \mu\text{mol/mL menit}$

$$K_m = \frac{b}{a}$$

K_m (tanpa inhibitor) = $\frac{0,113}{1,234} = 0,092 \mu\text{mol/mL}$

K_m (dengan inhibitor) = $\frac{0,321}{1,230} = 0,261 \mu\text{mol/mL}$