



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF
INHIBITOR • -GLUKOSIDASE DARI FRAKSI *n*-BUTANOL
RIMPANG *Acorus calamus* L.**

TESIS

**AHMAD NAJIB
0806477030**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
DESEMBER 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF
INHIBITOR • -GLUKOSIDASE DARI FRAKSI *n*-BUTANOL
RIMPANG *Acorus calamus* L.**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister sains

**AHMAD NAJIB
0806477030**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
DESEMBER 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : AHMAD NAJIB

NPM : 0806477030

Tanda Tangan :

Tanggal : 16 Desember 2010



HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Ahmad Najib
NPM : 0806477030
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian
Judul Tesis : ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA
AKTIF INHIBITOR •-GLUKOSIDASE DARI
FRAKSI *n*-BUTANOL RIMPANG *Acorus calamus* L.

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Berna Elya, M.Si ()
Pembimbing : Dr. Sri Hartati, M.Si ()
Penguji : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc ()
Penguji : Dr. Abdul Mun'im, MS ()
Penguji : Prof. Dr. Sumali Wiryowidagdo ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 16 Desember 2010

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan syukur atas segala karunia dan nikmat yang Allah *Subhanahu Wa Ta 'Ala* telah berikan sehingga tugas akhir ini dapat kami selesaikan, demikian pula terima kasih yang sebesar-besarnya kami tujukan kepada :

1. Ibu Dr. Berna Elya, M.Si, selaku pembimbing pertama, Ibu Dr. Sri Hartati, M.Si, selaku pembimbing kedua yang memiliki andil besar dalam proses penelitian dan penyelesaian tugas akhir kami ini, semoga segala bantuan dan bimbingan ibu berdua mendapat imbalan yang setimpal di sisi-Nya.
2. Bapak Kepala Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia beserta staf atas penggunaan segala fasilitas dan bantuannya selama penelitian.
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
4. Seluruh staf pengajar dan karyawan serta rekan-rekan mahasiswa Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
5. Semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyelesaian tugas akhir ini, terutama kepada Prof. Dr. Soleh Kosela, M.Sc atas diskusi yang sangat bermanfaat dan Kopol. Koeswardhani, S.Si, Apt yang telah memberikan fasilitas laboratorium GC-MS.

Tidak lupa kepada kedua orang tua kami, ayahanda Pudzjiaman Zainuddin dan ibunda Mulyati Madjid yang telah memelihara dan mendidik kami, semoga segala amalan dan jerih payah keduanya mendapat balasan disisi-Nya, dan seluruh keluarga yang turut mendorong dan senantiasa memotivasi kami untuk menyelesaikan studi kami, terutama kepada istriku tersayang drg. Wisudarjianti Mahmud serta ananda Afifah Ahmad dan Abdullah Ahmad.

Harapan kami semoga tesis ini dapat berguna bagi pengembangan ilmu farmasi.

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Ahmad Najib
NPM : 0806477030
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Tesis

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

“Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Aktif Inhibitor α -Glukosidase Dari Fraksi *n*-Butanol Rimpang *Acorus calamus* L.”

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, 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 : 16 Desember 2010

Yang menyatakan

(Ahmad Najib)

ABSTRAK

Nama : Ahmad Najib
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian
Judul : Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Aktif Inhibitor α -Glukosidase
Dari Fraksi *n*-Butanol Rimpang *Acorus calamus* L.

Tanaman *Acorus calamus* L. adalah anggota suku *Acoraceae*, memiliki rimpang yang mengandung bermacam-macam komponen kimia, dan secara turun temurun telah digunakan sebagai bahan obat termasuk diantaranya sebagai obat antidiabetes. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menentukan struktur senyawa aktif inhibitor α -glukosidase dalam fraksi *n*-butanol dari rimpang *A. calamus* L. Isolasi senyawa dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom dengan *guide line* uji aktivitas α -glukosidase. Penentuan struktur senyawa kimia dilakukan dengan menganalisis data spektroskopi UV-Vis, MS, IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$, dan diperoleh senyawa dengan rumus molekul $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ (*1,1'-(1,4-phenylene)bis(2-hydroxyethanone)*) dan berat molekul 194. Pengujian aktivitas senyawa yang selanjutnya disebut AFB (*Acorus* Fraksi *Butanol*) terhadap inhibisi enzim α -glukosidase secara *in vitro* menunjukkan bahwa senyawa AFB, mampu menghambat aktivitas enzim α -glukosidase dengan nilai IC_{50} 17,89 $\mu\text{g/mL}$.

Kata kunci : *Acorus calamus* L., Inhibitor α -glukosidase, antidiabetes
xiii+65 halaman : 12 gambar; 9 tabel
Daftar Pustaka : 60 (1978-2010)

ABSTRACT

Name : Ahmad Najib
Program Study : Magister of Pharmacy
Title : Isolation and Identification of α -Glucosidase Inhibitory
Compound From *n*-Butanol Fraction of *Acorus calamus* L.
Rhizomes

Acorus calamus L. belonging to Acoraceae family has been known as having many active compounds and use in the traditional medication, including as antidiabetic. The aim of the research was to isolate and determine the α -glucosidase inhibitory active compound from *n*-butanolic fraction of *A. calamus* L. rhizomes. The isolation was done using column chromatography method with α -glucosidase bioassay guide line and the structure determined was done based on spectral data of UV-Vis, MS, IR, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$, give result compound with molecular formula $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ (*1,1'-(1,4-phenylene)bis(2-hydroxyethanone)*) and molecular weight 194 and then named ABF (Acorus Butanol Fraction). Inhibitory assay of ABF compound activity by *in vitro* method using enzyme α -glucosidase. The result showed that the active compound as enzyme inhibitor with IC_{50} value of 17.89 $\mu\text{g/mL}$.

Key Words : *Acorus calamus* L., α -glucosidase inhibitory, antidiabetes
xiii+65 pages : 12 pictures; 9 tables
Bibliography : 60 (1978-2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	v
ABTRAK.....	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1 Klasifikasi Tanaman.....	3
2.2 Uraian Tanaman.....	3
2.2.1 Morfologi	3
2.2.2 Ekologi dan Penyebaran	3
2.2.3 Nama Daerah dan Sinonim	4
2.2.4 Bagian Tanaman yang Digunakan	4
2.3 Kandungan Rimpang <i>Acorus calamus</i> L.....	5
2.4 Sifat Farmakologi Tanaman	6
2.4.1 Antidiabetes	6
2.4.2 Antiproliferasi/immunosupresive.....	6
2.4.3 Antikarsinogenesis	6
2.4.4 Antiinflamasi.....	6
2.4.5 Antidiare	7
2.4.6 Antioksidan	7
2.4.7 Antimikroba	7
2.4.8 Psikotropika	8
2.4.9 Analgesik	8
2.4.10 Antihiperlipidemia.....	8
2.5 Diabetes Mellitus	8
2.5.1 Klasifikasi Diabetes Mellitus.....	9
2.5.1.1 <i>Insulin Dependent Diabetes Mellitus</i>	9
2.5.1.2 <i>Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus</i>	9
2.5.1.3 Diabetes Mellitus Terkait Malnutrisi.....	9
2.5.1.4 Diabetes Mellitus dengan Sindrom Tertentu.....	10
2.5.2 Faktor Penyebab Diabetes Mellitus.....	10
2.5.2.1 Faktor Genetik atau Keturunan	10

2.5.2.2	Virus Dan Bakteri	10
2.5.2.3	Bahan Toksik Atau Beracun	10
2.5.2.4	Nutrisi.....	10
2.5.3	Diagnosis Diabetes Mellitus	10
2.5.4	Pengobatan Diabetes	11
2.5.4.1	Golongan Sulfonilurea	12
2.5.4.2	Golongan Biguanid	12
2.5.4.3	Golongan Thiazolidinedion.....	12
2.5.4.4	Golongan Inhibitor • -Glukosidase	12
2.6	Enzim • -Glukosidase	13
2.7	Mekanisme Kerja Obat Sebagai Inhibitor Reaksi Enzim.....	14
2.7.1	Inhibisi <i>Reversibel</i>	14
2.7.1.1	Inhibisi <i>Reversibel</i> kompetitif	14
2.7.1.2	Inhibisi <i>Reversibel</i> non kompetitif.....	15
2.7.2	Inhibisi <i>Irreversibel</i>	15
2.8	Uji Inhibisi • -Glukosidase.....	15
2.9	Tanaman Obat Antidiabetes	16
2.10	Ekstraksi	17
2.10.1	Ekstraksi Secara Soxhletasi	17
2.10.2	Ekstraksi Secara Perkolasi	17
2.10.3	Ekstraksi Secara Maserasi.....	17
2.10.4	Ekstraksi Secara Refluks	18
2.10.5	Ekstraksi Dengan Penyulingan Uap Air.....	18
2.11	Kromatografi.....	18
2.11.1	Kromatografi Cair (<i>Liquid Chromatography</i>).....	19
2.11.2	<i>Reverse Phase Chromatography</i>	19
2.11.3	<i>High Performance Liquid chromatography</i>	19
2.11.4	<i>Size Exclusion Chromatography</i>	20
2.11.5	<i>Ion Exchange Chromatography</i>	20
2.12	Metode Identifikasi	20
BAB 3.	METODE PENELITIAN.....	22
3.1	Lokasi Penelitian	22
3.2	Bahan.....	22
3.2.1	Rimpang	22
3.2.2	Bahan Kimia	22
3.3	Alat	22
3.4	Cara Kerja.....	23
3.4.1	Ekstraksi	23
3.4.2	Partisi	23
3.4.3	Kolom Kromatografi	23
3.4.4	Uji Inhibisi • -Glukosidase.....	24
3.4.4.1	Preparasi Ekstrak	25
3.4.4.2	Preparasi Enzim.....	25
3.4.4.3	Pengujian Blangko.....	25
3.4.4.4	Pengujian Sampel	25
3.4.4.5	Pengujian Sampel Tanpa Enzim.....	25

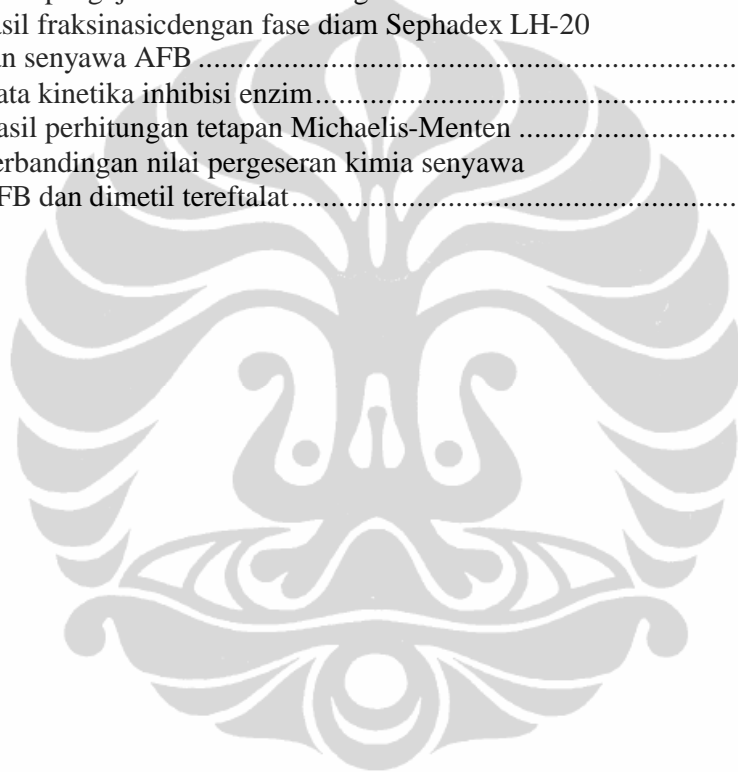
3.4.4.6 Perhitungan Inhibisi dan IC_{50}	26
3.4.4.7 Penentan Kinetika Inhibisi Enzim	26
3.4.5. Identifikasi Senyawa Aktif Antidiabetes	27
3.4.5.1 Pemeriksaan Spektrum <i>Ultraviolet</i>	27
3.4.5.2 Pemeriksaan Spektrum Infra Merah (IR).....	27
3.4.5.3 Pemeriksaan Spektrum NMR.....	27
3.4.5.4 Pemeriksaan Spektrum Massa dengan GC-MS	28
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Hasil Penelitian	29
4.1.1 Ekstraksi Dan Partisi	29
4.1.2 Kolom Kromatografi	29
4.1.3 Uji Efek Inhibisi • -Glukosidase.....	30
4.1.4 Penentuan Kinetika Inhibisi Enzim.....	32
4.1.5 Identifikasi Senyawa AFB (Acorus Fraksi Butanol).....	33
4.2 Pembahasan	33
4.2.1 Ekstraksi Dan Partisi	33
4.2.2 Kolom Kromatografi	34
4.2.3 Uji Efek Inhibisi • -Glukosidase.....	35
4.2.4 Penentuan Kinetika Inhibisi Enzim.....	36
4.2.5 Identifikasi Senyawa AFB (Acorus Fraksi Butanol).....	37
4.2.5.1 Spektrum Uv- Vis.....	37
4.2.5.2 Spektrum Infra Merah (IR)	37
4.2.5.3 Spektrum Resonansi Magnetik Inti (NMR)	37
4.2.5.4 Spektrum Massa	39
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	43
DAFTAR REFERENSI.....	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Foto tanaman <i>Acorus calamus</i> L.	4
Gambar 2.2	Beberapa struktur senyawa kimia rimpang <i>Acorus calamus</i> L.	5
Gambar 2.3	Tempat aksi obat pada pengobatan diabetes	11
Gambar 2.4	Struktur kimia Acarbose	13
Gambar 2.5	Persamaan reaksi enzimatik •-glukosidase dan <i>p</i> -nitrofenil-•-D-glukopiranosida	15
Gambar 2.6	Tempat Aksi Beberapa Tanaman Pada Pengobatan Diabetes	16
Gambar 4.1	Grafik kinetika inhibisi enzim	37
Gambar 4.2	Hubungan antara atom karbon dan proton (MHQC) senyawa AFB	38
Gambar 4.3	Hubungan antara atom karbon dan proton (MHBC) senyawa AFB	39
Gambar 4.4	Pola fragmentasi spektrum massa pada senyawa AFB	40
Gambar 4.5	Struktur dimetil tereftalat dan asam tereftalat	41
Gambar 4.6	Struktur senyawa AFB	42

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Sisten reaksi uji inhibisi • -glukosidase	26
Tabel 4.1	Hasil partisi serbuk <i>Acorus calamus</i> L.....	29
Tabel 4.2	Hasil isolasi kolom kromatografi dengan fase diam resin.....	29
Tabel 4.3	Hasil isolasi kolom kromatografi dengan fase diam Sephadex LH 20	30
Tabel 4.4	Hasil pengujian efek inhibisi • -glukosidase ekstrak <i>n</i> -butanol, ekstrak air dan fraksi hasil kolom dengan fase diam resin.....	30
Tabel 4.5	Hasil pengujian efek inhibisi • -glukosidase isolat hasil fraksinasi dengan fase diam Sephadex LH-20 dan senyawa AFB	31
Tabel 4.6	Data kinetika inhibisi enzim.....	32
Tabel 4.7	Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten	33
Tabel 4.8	Perbandingan nilai pergeseran kimia senyawa AFB dan dimetil tereftalat.....	41



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Hasil identifikasi tanaman.....	49
Lampiran 2.	Skema kerja.....	50
Lampiran 3.	Spektrum UV-Vis senyawa AFB.....	51
Lampiran 4.	Spektrum Infra Merah senyawa AFB.....	52
Lampiran 5a.	Spektrum resonansi magnetik inti proton senyawa AFB.....	53
Lampiran 5b.	Spektrum resonansi magnetik inti proton senyawa AFB (ekspansi).....	54
Lampiran 6a.	Spektrum resonansi magnetik inti karbon senyawa AFB.....	55
Lampiran 6b.	Spektrum resonansi magnetik inti karbon senyawa AFB (ekspansi).....	56
Lampiran 7a.	Spektrum HMQC senyawa AFB.....	57
Lampiran 7b.	Spektrum HMQC senyawa AFB (ekspansi).....	58
Lampiran 8a.	Spektrum HMBC senyawa AFB.....	59
Lampiran 8b.	Spektrum HMBC senyawa AFB (ekspansi).....	60
Lampiran 8c.	Spektrum HMBC senyawa AFB (ekspansi).....	61
Lampiran 9a.	Spektrum DEPT ¹³ CNMR senyawa AFB.....	62
Lampiran 9b.	Spektrum DEPT ¹³ CNMR senyawa AFB (ekspansi).....	63
Lampiran 10.	Kromatogram <i>gas chromatography</i> (GC) Senyawa AFB.....	64
Lampiran 11.	Spektrum EI-MS senyawa AFB.....	65

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keanekaragaman flora Indonesia sangat mendukung sebagian besar penyediaan bahan baku obat tradisional. Obat tradisional, berasal dari tumbuhan yang telah lama dikenal dan dimanfaatkan secara luas oleh masyarakat Indonesia. Penggunaan untuk mengobati suatu penyakit didasarkan pada pengalaman empiris yang diwariskan secara turun temurun. Dari empat puluh ribu jenis flora yang tumbuh di dunia, tigapuluh ribu jenis di antaranya tumbuh di Indonesia dan sebagian besar masih tumbuh liar (Farnsworth, 1983).

Khasiat tumbuhan obat disebabkan oleh kandungan zat berkhasiat yang terdapat dalam tanaman. Kandungan kimia yang ada dalam suatu tanaman sangat banyak jenisnya, tetapi kadarnya relatif kecil. Oleh karena itu cara mengisolasi senyawa-senyawa kimia tersebut merupakan permasalahan yang cukup kompleks. Selain itu uji yang dilakukan tidak hanya menentukan strukturnya, tetapi juga uji aktivitas, uji toksisitas dan kadang-kadang diperlukan percobaan transformasi, supaya senyawa yang diisolasi dapat diubah menjadi senyawa yang berkhasiat atau ditingkatkan khasiatnya (Zaini, 1993).

Rimpang *Acorus calamus* L. (suku Acoraceae), ribuan tahun yang lalu telah digunakan pada sistem pengobatan India dan Cina, tanaman ini sangat berguna pada pengobatan sistem saraf pusat (SSP) yang abnormal. Selain itu banyak digunakan secara tradisional di Amerika dan Cina untuk mengobati diabetes, begitu pula masyarakat Banten menggunakannya untuk mengobati penyakit yang sama (Hao *et al.*, 2009; Parab & Mengi, 2002).

Suku Indian Dakota menggunakan rimpang *A. calamus* L. untuk mengobati diabetes dan telah dilaporkan beberapa kasus penggunaan rimpang oleh mereka yang telah berputus asa terhadap menggunakan obat bahan kimia. Ketika mereka mengunyah rimpang *A. calamus* L. secara teratur, mereka dapat merasakan kesembuhan penyakitnya selama kurang dari sebulan (Cesspooch, 2005).

A. calamus L. di Canada termasuk dalam daftar tumbuhan yang digunakan untuk pengobatan antidiabetes (Jarald, 2008), sedangkan ekstrak etanolnya digunakan sebagai antidiabetes, anti proliferasi dan antidiare (Palani *et al.*, 2009). Penelitian yang dilakukan oleh Jenney menunjukkan adanya aktivitas inhibisi α -glukosidase pada ekstrak etil asetat *A. calamus* L. dan memperoleh senyawa acoramon yang dapat digunakan sebagai penanda (*marker*) (Jenney, 2007).

Penelitian Mei (*et al.*, 2010) pada fraksi ekstrak etil asetat *A. calamus* menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap α -glukosidase dengan IC_{50} 0,41 μ g/mL dan 100 mg/kg ekstrak secara jelas mengurangi peningkatan kadar glukosa darah setelah pemberian 5 g/kg amilum pada mencit yang normal (Mei, *et al.*, 2010).

1.2 Rumusan Masalah

Penelitian terhadap aktivitas inhibisi α -glukosidase rimpang *A. calamus* L. sejauh ini hanya pada fraksi yang berasal dari ekstrak non polar dan semipolar, sehingga masih terbuka kesempatan untuk melakukan penelitian pada pada fraksi yang berasal dari ekstrak yang lebih polar seperti *n*-butanol, guna mencari senyawa baru yang memiliki potensi sebagai antidiabetes dengan mekanisme inhibisi α -glukosidase.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan menentukan struktur senyawa aktif inhibitor α -glukosidase dari fraksi *n*-butanol rimpang *A. calamus* L.

1.4 Manfaat Penelitian

Menambah data ilmiah tentang *A. calamus* L. sebagai tanaman yang berkhasiat sebagai antidiabetes dalam rangka pengembangan pengobatan tradisional.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi Tanaman

Kerajaan	: Plantae
Subkerajaan	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Subkelas	: Arecidae
Bangsa	: Arales
Suku	: Acoraceae
Marga	: Acorus
Jenis	: <i>Acorus calamus</i> L. (<i>Integrated Taxonomic Information System</i> , 2010)

2.2 Uraian Tanaman

2.2.1 Morfologi

Tumbuhan tinggi 55 cm sampai 80 cm, berakar rimpang dengan garis tengah 7,5 mm sampai 15 mm. Daun berbentuk pita, tajam, agak lonjong ke ujung, panjang helai daun 80 cm, lebar 7 mm sampai 20 mm. Perbungaan berupa tongkol, berbentuk bukit memanjang pendek dan pada ujung tajam, panjang 3 cm sampai 4,5 cm dengan gagang bunga panjang 20 cm sampai 25 cm, daun mahkota bunga sempit, berbentuk bulat memanjang, tidak berambut, panjang 1 mm sampai 1,25 mm, tangkai sari panjang 2,74 mm, kepala sari 0,3 mm, putik tidak berambut, panjang 1,5 mm sampai 2,25 mm, lebar 2,25 mm sampai 4,75 mm, kepala putik rata, panjang 0,5 mm, bakal buah berjumlah 7 sampai 10 (Depkes RI, 1978).

2.2.2 Ekologi dan Penyebaran

Tumbuhan ini berasal dari daerah Asia yang beriklim sedang termasuk daerah India dan mungkin disekitar Laut Hitam dan Kaspia, di tanah yang becek atau berawa. Tumbuh di India, Indonesia, Filipina dan Indocina. Di Indonesia terdapat pada beberapa pulau tertentu, tersebar dari tempat asal ke arah barat dan tenggara, dikenal sebagai tumbuhan rawa yang menyukai tanah berpasir. Di Jawa

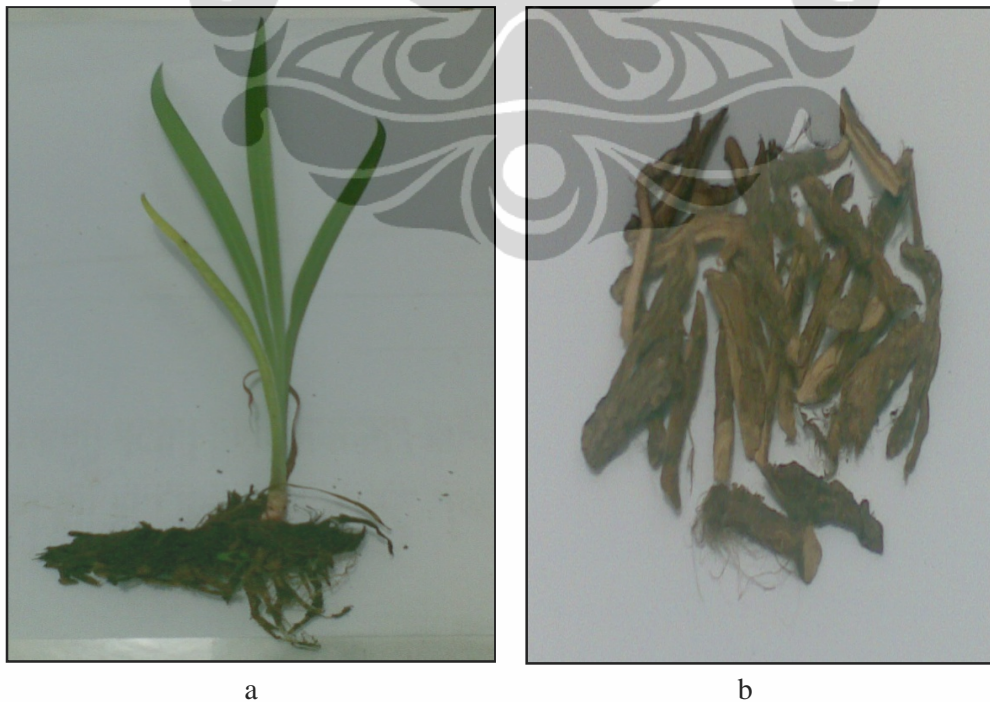
tumbuh disepanjang parit, kolam ikan, di telaga, di rawa pada ketinggian sampai 2.050 m di atas permukaan laut. Di Jawa kemungkinan tumbuhan berasal dari sisa tanaman yang dibiarkan tumbuh secara liar (Depkes RI, 1978).

2.2.3 Nama Daerah dan Sinonim

Sumatra	: Jeurunger (Aceh), Jerango (Karo, Batak), Jarianggu (Minangkabau)
Jawa	: Daringo (Sunda), Dligo (Jawa Tengah)
Madura	: Jharango
Bali	: Jangu
Nusa Tenggara	: Kaliraga (Flores), Jeringo (Sasak)
Sulawesi	: Kareango (Makassar), Kalango (Minahasa), Areango (Bugis)
Maluku	: Bila (Buru), Ai Wahu (Ambon) (Balitbang Depkes, 1991)
Sinonim	: Vacha, Sadgrantha (Sangsekerta), Calamus, Sweet Flag (Ingris), Vashambu (Tamil) (Yende, <i>et al.</i> , 2008).

2.2.4 Bagian Tanaman yang Digunakan

Akar dan rimpang (Yende *et al.*, 2008), daun (Pandy, Jose & Subhash, 2009)



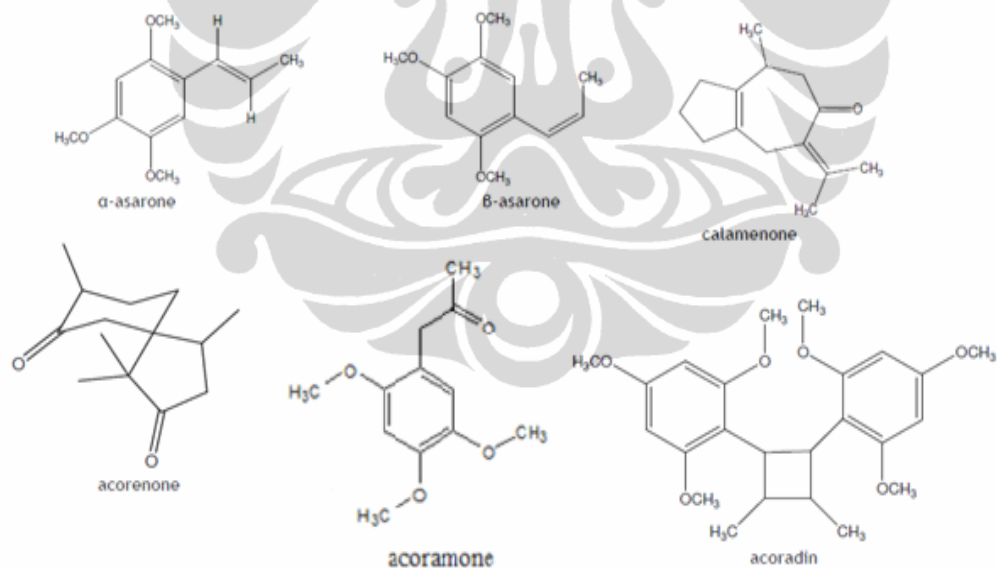
Gambar 2.1 Foto tanaman (a) dan rimpang *A. calamus* L. (b)

2.3 Kandungan Kimia Rimpang *A. calamus* L.

Kandungan kimia yang terdapat pada rimpang tanaman adalah minyak atsiri berupa 1,2,4-trimetoksi-5-(1-profenil)-benzena atau yang lebih dikenal sebagai asaron, kalamenol, kalamene, kalamone, metil eugenol, eugenol (Mazza, 1985), juga ditemukan minyak atsiri yang mengandung terpena berupa kalamine, kalamenone, eugenol, kamfene, pinene dan asaronaldehida (Nalawar *et al.*, 2009), kandungan seskuiterpen yaitu acolamone, acoragermacrone dan isoacolamone (Mazza, 1985).

Hao menemukan kurang lebih 25 senyawa kimia dalam minyak atsiri yang telah diidentifikasi, komponen utama diantaranya adalah cis-asaron, trans-asaron α -patchoulen, β -caryophyllen, humulen, metil-eugenol, elemicine, cis-ocimen (Hao *et al.*, 2007). Fenilpropanolamin, flavonoid dan quinon juga ditemukan pada tanaman ini (Patra & Mitra, 1979).

Beberapa struktur pada tanaman ini dapat dilihat pada gambar di bawah.



[Sumber : Yende, *et al.*, 2008 & Jenney, 2007]

Gambar 2.2 Beberapa struktur senyawa kimia rimpang *A. calamus* L.

2.4 Sifat Farmakologi Tanaman

2.4.1 Antidiabetes

Ekstrak etil asetat rimpang *A. calamus* L. meningkatkan sekresi insulin pada sel lestari (*cell line*) HIT-T15. Hasil *in vivo* pada pemberian ekstrak (400 and 800 mg/kg) secara nyata menurunkan kadar serum glukosa darah pada saat puasa dan menekan peningkatan kadar gula darah setelah pemberian glukosa 2g/kg pada mencit (Mei, *et al.*, 2010). Penelitian Hao (*et al.*, 2007) menemukan aktivitas potensial dari ekstrak etil asetat *A. calamus* L. Yang meningkatkan sensitivitas insulin yang cukup signifikan seperti rosiglitazone (obat pembanding). Hao menyatakan bahwa fraksi ekstrak etil asetat *A. calamus* L. memiliki aktivitas hipolipidemia dan efek berguna lainnya berdasarkan mekanisme perangsangan terhadap insulin. Hal ini menunjukkan *A. calamus* L. memiliki potensi untuk digunakan pada pengobatan penyakit diabetes dan komplikasi kardiovaskular pada pasien yang tidak mengalami kelebihan berat badan (Hao *et al.*, 2009).

2.4.2 Antiproliferasi/immunosupresive

Ekstrak etanol *A. calamus* dengan dosis 10,50 dan 100 µg/mL memiliki aktivitas yang cukup bermakna sebagai agen immunosupresive pada sel mitogen (PHA) dan antigen (PPD)-PBMCs dari sel manusia (Mehrotra *et al.*, 2003).

2.4.3 Antikarsinogenesis

Senyawa •-asarone dalam *A. calamus* memiliki aktivitas antikarsinogenik terhadap sel karsinoma manusia. Lektin terbaru yang diisolasi dari rimpang dari dua spesies *Acorus* yaitu *A. calamus* (Linn.) dan *A. gramineus*. Lektin ini menunjukkan aktivitas yang potensial pada sel limpa mencit dan sel limfosit manusia. Baik *A. calamus* dan *A. gramineus* mampu menghambat pertumbuhan J774, murine makrofag dari *cell-line* (sel lestari) kanker dan limfoma sel B (Bains *et al.*, 2005).

2.4.4 Antiinflamasi

Ekstrak air *A. calamus* memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi, pada sel keratinosit HaCaT, mampu mengurangi ekspresi dan sekresi dari IL-6 dan IL-8 pada RNA dan kadar protein dalam sel HaCaT yang di stimulasi oleh PGN dan polyI:C (Hyeri, Tae & Seong, 2009).

2.4.5 Antidiare

Penelitian Gilani memperoleh bahwa ekstrak kasar dari *A. calamus* memiliki manfaat sebagai antispasmodik/antidiare, dengan melihat efek dari ekstrak pada usus jejunum kelinci diperoleh bahwa fraksi *n*-heksana dari ekstrak mengandung zat penghambat kanal kalsium (Gilani *et al.*, 2006).

2.4.6 Antioksidan

Ekstrak etil asetat rimpang *A. calamus* mampu mencegah perubahan pada otak tikus setelah diinduksi dengan stres bising secara efektif. Efek anti stres ini kemungkinan disebabkan oleh terjadinya peningkatan kapasitas antioksidan di jaringan otak yang ditimbulkan oleh adanya penurunan GSH, vitamin C dan kadar vitamin E serta aktivitas enzim penghambat radikal bebas. Ini adalah penelitian pertama yang menyatakan bahwa ekstrak etil asetat dan metanol dari *A. calamus* L. dapat dipergunakan sebagai obat untuk penyakit yang berhubungan dengan pola atau gaya hidup dan mampu meningkatkan kondisi kesehatan pada manusia. Uji keamanan obat yang lebih intensif harus dilakukan sebelum pemakaian *A. calamus* sebagai anti stresor secara klinis (Manikandan *et al.*, 2005).

2.4.7 Antimikroba

•-Asaron sebagai komponen utama dari ekstrak metanol *A. calamus* memiliki aktivitas yang tinggi sebagai anti mikroba terhadap *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum* dan *Penicillium marneffeii* dan aktivitas sedang terhadap *Candida albicans* dan *C. neoformans*. Mungkornawasakul (2000) mengukur aktivitas anti jamur dari ekstrak diklorometana akar *A. calamus* dengan KLT-bioatografi menggunakan *Cladosporium cladosporioides* dan menemukan bahwa *cis-asarone* adalah komponen utama yang terkandung didalamnya sementara Thirach (*et al.*, 2003) melaporkan bahwa ekstrak etanol *A. calamus* menghambat pertumbuhan *C. albicans* (Phongpaichit *et al.*, 2005).

Isolat dari ekstrak metanol rimpang *A. calamus* yang diperoleh dari kolom kromatografi diujikan aktivitas antimikrobanya pada berbagai mikroorganisme termasuk bakteri, ragi dan jamur. Diperoleh hasil dengan aktivitas tinggi pada jamur: *Trichophyton rubrum*, *Microsporium gypseum*, dan *Penicillium marneffeii* dengan nilai IC₅₀ 0,2; 0,2 dan 0,4 mg/mL. Aktivitas sedang pada ragi: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* dan *Saccharomyces*

cerevisiae (MIC 0,1-1 mg/mL) dan aktivitas rendah pada bakteri (MIC₅₀ 10 mg/mL) (Phongpaichit *et al.*, 2005).

2.4.8 Psikotropika

Ekstrak metanol dan aseton *A. calamus* menunjukkan aktivitas sebagai obat penekan susunan saraf pusat dari studi yang dilakukan oleh Pandy, ditemukan bahwa kedua ekstrak *A. calamus* ini mampu menekan aktivitas pergerakan spontan pada mencit dan meningkatkan kemampuan kerja diazepam untuk menginduksi tidur pada mencit dan aktivitas SSP lainnya. Aktivitas sebagai penekan susunan saraf pusat ini dapat dimanfaatkan untuk penelitian di bidang obat anti kejang (Pandy, Jose & Subhash, 2009).

2.4.9 Analgesik

Ekstrak metanol rimpang *A. calamus* diteliti untuk melihat aktivitasnya sebagai obat anti nyeri dengan menggunakan metode *hot plate* pada mencit. Hasil *hot plate* menunjukkan bahwa pemberian ekstrak metanol sebesar 200 mg/kg bb mampu memperpanjang daya tahan mencit di *hot plate* sampai dengan 120 menit, lebih lama dibanding Pentazocine sebagai obat pembanding. Hal ini menyatakan bahwa ekstrak metanol dari *A. calamus* memiliki efek sebagai analgetik sebagaimana dinyatakan sebelumnya bahwa *A. calamus* sudah digunakan sebagai obat tradisional pereda nyeri (Tippani *et al.*, 2008).

2.4.10 Antihiperlipidemia

A. calamus secara empiris telah banyak digunakan untuk mengobati berbagai macam penyakit. Pemberian ekstrak etanol sebesar 50% (100 dan 200 mg/kg bb) sama dengan jumlah saponin (10 mg/kg bb) yang diisolasi dari rimpangnya menunjukkan aktivitas sebagai hipolipidemik. Sebaliknya, aktivitas hipolipidemik pada ekstrak air baru terlihat di dosis 200 mg/kg bb (Parab & Mengi, 2002).

2.5 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) didefinisikan sebagai suatu penyakit atau gangguan metabolisme kronis dengan multi etiologi yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid dan protein sebagai akibat insufisiensi fungsi insulin. Insufisiensi fungsi

insulin dapat disebabkan oleh gangguan atau defisiensi produksi insulin oleh sel-sel β - pulau langerhans kelenjar pankreas, atau disebabkan oleh kurang responsifnya sel-sel tubuh terhadap insulin (*Department of Noncommunicable WHO, 1999*).

Insulin adalah hormon yang dilepaskan oleh pankreas, yang bertanggung jawab dalam mempertahankan kadar gula darah yang normal. Insulin memasukkan gula ke dalam sel sehingga bisa menghasilkan energi atau disimpan sebagai cadangan energi (Utami, 2003).

2.5.1 Klasifikasi Diabetes Mellitus

2.5.1.1 *Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) / DM tipe 1*

Diabetes tipe ini jarang, diperkirakan 5-10% dari populasi penderita diabetes. Gangguan produksi insulin pada diabetes tipe ini umumnya terjadi karena kerusakan sel β - pulau langerhans yang disebabkan oleh autoimun, dan ada pula yang disebabkan oleh virus seperti Rubella, Herves, dan sebagainya.

Destruksi autoimun dari sel-sel β - pulau langerhans kelenjar pankreas langsung mengakibatkan defisiensi sekresi insulin. Selain itu, fungsi sel-sel β -pankreas pada penderita diabetes tipe 1 juga menjadi tidak normal yaitu ditemukan sekresi glukagon yang berlebihan oleh sel-sel β - pulau langerhans. Secara normal, hiperglikemia akan menurunkan sekresi glukagon, tapi pada penderita diabetes tipe 1 hal ini tidak terjadi (Dirjen Binfar Depkes, 2005).

2.5.1.2 *Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM) / DM tipe 2*

Diabetes tipe 2 lebih umum, mencapai 90-95% dari populasi penderita diabetes. Etiologinya multi faktor, faktor genetik dan lingkungan cukup besar dalam menyebabkan terjadinya diabetes tipe 2 antara lain obesitas, diet tinggi lemak dan rendah serat serta kurang gerak badan. Awal patofisiologi diabetes tipe 2 bukan disebabkan oleh kurangnya sekresi insulin, tetapi karena sel-sel sasaran insulin gagal atau tidak mampu merespon insulin secara normal (resistensi insulin) (Dirjen Binfar Depkes, 2005).

2.5.1.3 *Diabetes Mellitus Terkait Malnutrisi (DMTM)*

Salah satu penyebab terjadinya DMTM diduga karena kekurangan protein jangka panjang yang bersamaan dengan pemberian makanan utama singkong. HCN dari singkong akan merusak sel pankreas yang sebenarnya HCN

dapat dinetralkan oleh asam amino dari protein makanan dan selanjutnya dikeluarkan melalui urin (*cyanide-cassava hypotesis*) (Tjokroprawiro, Henratomo & Ari, 1988).

2.5.1.4 Diabetes Mellitus yang Berhubungan dengan Keadaan atau Sindrom Tertentu

Diabetes tipe ini disebabkan oleh keadaan atau sindrom tertentu seperti penyakit pankreas, hormonal, keadaan yang disebabkan oleh obat atau zat kimia, gangguan reseptor insulin dan sindrom genetik tertentu (Ellenberg & Harold, 1983).

2.5.2 Faktor Penyebab Diabetes Mellitus (Utami, 2003)

2.5.2.1 Faktor Genetik atau Keturunan

Pada sebagian besar penderita DM memiliki riwayat keluarga yang juga menderita DM.

2.5.2.2 Virus dan Bakteri

Virus yang diduga menyebabkan DM adalah *Rubela*, *Mumps* dan *Human coxsackievirus B4*. Hasil penelitian menyebutkan bahwa virus dapat menyebabkan DM melalui mekanisme infeksi sitolitik pada sel beta yang mengakibatkan kerusakan sel.

2.5.2.3 Bahan Toksik atau Beracun

Ada beberapa bahan toksik yang mampu merusak sel beta secara langsung yakni aloksan, pyrinuron (rodentisida) dan streptozotocin (produk dari sejenis jamur).

2.5.2.4 Nutrisi

Nutrisi berlebihan (*overnutrition*) merupakan faktor resiko pertama yang diketahui menyebabkan DM, semakin lama dan berat obesitas akibat nutrisi berlebihan, semakin besar kemungkinan terjangkitnya DM.

2.5.3 Diagnosis Diabetes Mellitus

Diagnosis dapat dilakukan dengan pemeriksaan darah, yaitu Tes Toleransi Glukosa Oral (TTGO) standar menurut WHO. TTGO secara umum dilakukan dengan cara mengukur kadar glukosa darah puasa setelah pasien berpuasa selama 10-12 jam, kemudian pasien diberi minum larutan glukosa 75 g di dalam 250-300 mL air. Kadar glukosa darah diukur kembali setelah 1 jam dan

2 jam setelah minum larutan glukosa. Darah yang diperiksa adalah dari vena sekitar lipat siku (*Department of Noncommunicable WHO, 1999*).

Seseorang dikatakan menderita diabetes jika memiliki kadar glukosa darah puasa lebih besar dari 7,0 mmol/L (126 mg/dL) dan pada tes glukosa darah sewaktu lebih besar 11,1 mmol/L (200 mg/dL), 2 jam setelah pemberian larutan glukosa. Seseorang dikatakan terganggu terhadap toleransi glukosa apabila hasil pemeriksaan kadar glukosa darah puasa kurang dari 7,0 mmol/L (126 mg/dL) dan kadar glukosa darah 2 jam setelah minum larutan glukosa • 7,8 mmol/L (140 mg/dL) dan normal apabila pemeriksaan kadar glukosa darah puasa kurang dari 6,1 mmol (110 mg/dL) dan kadar glukosa darah 2 jam setelah minum larutan glukosa kurang dari 7,8 mmol/L (140 mg/dL) (*Department of Noncommunicable WHO, 1999*).

2.5.4 Pengobatan Diabetes

Terdapat beberapa jenis obat yang dapat menurunkan kadar glukosa darah sebagaimana yang dapat dilihat pada Gambar 2.3 termasuk di dalamnya obat yang meningkatkan sekresi insulin (sulfonylurea, glibenklamid, meglitinida), memperbaiki fungsi insulin (biguanida, metformin, thiazolidinedion) dan inhibitor •-glukosidase (miglitol, acarbose) (Hongxiang, Tang & Liang, 2009).



[Sumber : Hongxiang, Tang & Liang, 2009]

Gambar 2.3 Tempat aksi obat pada pengobatan diabetes

2.5.4.1 Golongan Sulfonilurea

Derivat sulfonilurea bekerja dengan cara merangsang sel β -pulau Langerhans untuk mengekskresikan insulin. Obat golongan ini tidak berguna bila diberikan pada penderita DM tipe 1, karena pada penderita DM tipe 1 sel β -pulau langerhans sudah rusak, sehingga tidak dapat memproduksi insulin. Obat golongan ini dapat berguna bila diberikan pada penderita DM tipe 2 (Ganiswara *et al.*, 1999).

2.5.4.2 Golongan Biguanid

Derivat biguanid mempunyai mekanisme kerja yang berlainan dengan derivat sulfonilurea, obat-obat golongan ini bekerja dengan cara mengurangi retensi insulin, sehingga glukosa dapat memasuki sel-sel hati, otot dan organ tubuh lainnya. Obat-obat yang termasuk golongan biguanid adalah Metformin, Phenformin dan Buformin (Silva, 2004).

2.5.4.3 Golongan Thiazolidinedion

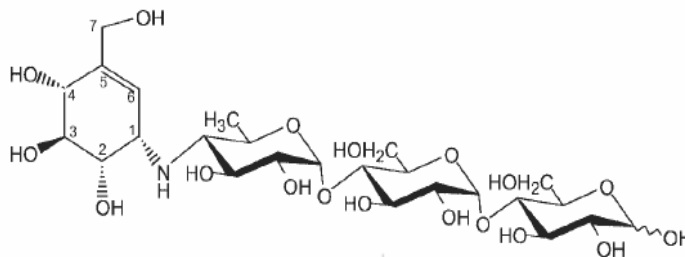
Derivat thiazolidinedion bekerja dengan cara yang sama dengan derivat biguanid yaitu mengurangi retensi insulin, sehingga glukosa dapat memasuki sel-sel hati, otot dan organ tubuh lainnya. Obat yang termasuk golongan thiazolidinedion adalah Troglitazone (Silva, 2004).

2.5.4.4 Golongan Inhibitor α -glukosidase

Golongan obat ini bekerja dengan cara menginhibisi secara reversibel kompetitif terhadap enzim hidrolase α -amilase pankreatik dan enzim-enzim pencernaan di usus halus seperti isomaltase, sukrase dan maltase. Enzim-enzim ini berperan pada hidrolisis karbohidrat makanan menjadi glukosa dan monosakarida lainnya. Pada penderita DM, inhibisi terhadap enzim ini menyebabkan penghambatan absorpsi glukosa sehingga menurunkan keadaan hiperglikemia setelah makan. Obat yang termasuk golongan ini adalah Acarbose dan di Indonesia telah dipasarkan dengan nama dagang Glucobay.

Acarbose adalah suatu oligosakarida yang diperoleh dari proses fermentasi mikroorganisme, *Actinoplanes utahensis*, dengan nama kimia *O*-4,6-dideoxy-4-[[[(1S,4R,5S,6S)-4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-cyclohexene-1-yl]amino]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucose. Acarbose merupakan serbuk berwarna putih dengan berat molekul 645,6

bersifat larut dalam air dan memiliki pKa 5,1. Rumus empiriknya adalah $C_{25}H_{43}NO_{18}$ dengan struktur kimia sebagai berikut (Slagle, 2002; Bayer, 2004).



[Sumber : Goldsmith, Fletterick, & Withers 1987]

Gambar 2.4 Struktur kimia Acarbose

Pada negara yang sudah maju, telah dipikirkan upaya cangkok pankreas untuk mengganti pankreas yang sudah rusak, hanya saja hasilnya sampai saat ini belum ada yang memuaskan. Kemajuan teknologi dewasa ini telah menemukan banyak obat tablet jenis baru dengan hasil yang cukup menggembirakan, demikian pula bermacam-macam insulin baru telah dipasarkan. Sehingga disamping angka kejadian diabetes yang terus meningkat, kemajuan dalam pengobatan diabetes juga terus berpacu untuk mengantisipasinya (Slagle, 2002).

2.6 Enzim •-Glukosidase

Enzim •-glukosidase adalah enzim yang bertanggung jawab terhadap konversi karbohidrat menjadi glukosa. Karbohidrat akan dicerna oleh enzim di dalam mulut dan usus menjadi gula yang lebih sederhana yang kemudian akan diserap ke dalam tubuh dan meningkatkan kadar gula darah. Proses pencernaan karbohidrat tersebut menyebabkan pankreas melepaskan enzim •-glukosidase ke dalam usus yang akan mencerna karbohidrat menjadi oligosakarida yang kemudian akan diubah lagi menjadi glukosa oleh enzim •-glukosidase yang dikeluarkan oleh sel-sel usus halus yang kemudian akan diserap ke dalam tubuh. Dengan dihambatnya kerja enzim •-glukosidase, kadar glukosa dalam darah dapat dikembalikan dalam batas normal (Bösenberg, 2008).

Penghambat enzim •-glukosidase bekerja pada bagian enterosit yang terdapat pada *villi* usus halus, proses terbentuknya disakrida dan oligosakarida dicegah dengan penurunan penyerapan karbohidrat pada permukaan usus halus.

Secara keseluruhan penghambat enzim α -glukosidase menghambat penyerapan karbohidrat dengan menghambat enzim disakarida di usus (enzim ini bertanggung jawab dalam pencernaan karbohidrat). Obat ini terutama menurunkan kadar glukosa darah setelah makan. Efek sampingnya yaitu kembung, buang angin dan diare. Supaya lebih efektif obat ini harus dikonsumsi bersama dengan makanan (Bösenberg, 2008).

2.7 Mekanisme Kerja Obat Sebagai Inhibitor Reaksi Enzim

Inhibisi reaksi enzim merupakan suatu strategi utama dalam perancangan obat dan hampir sepertiga dari lima puluh jenis obat terpopuler yang diperdagangkan saat ini merupakan inhibitor enzim. Inhibisi dari suatu reaksi yang dikatalisis enzim dapat menghambat jalur metabolik utama dengan memblokir pembentukan dari suatu metabolit esensial maupun metabolit yang tidak diinginkan (Ophardt, 2003).

Enzim memiliki sisi aktif yang dapat mengenali secara spesifik substratnya yang sesuai, sehingga memungkinkan untuk merancang inhibitor enzim yang dapat menghalangi pengikatan substrat pada enzim, maka dapat menghambat terbentuknya produk dari suatu metabolit yang tidak diinginkan (Ophardt, 2003).

Pada dasarnya ada dua tipe inhibisi enzim yang disebabkan oleh obat sebagai inhibitor, yaitu inhibisi *reversibel* dan inhibisi *irreversibel* (Ophardt, 2003).

2.7.1 Inhibisi *Reversibel*

Inhibisi *reversibel* ditandai dengan adanya reaksi kesetimbangan diantara enzim dan obat sebagai inhibitor. Inhibitor *reversibel* berikatan dengan enzim melalui ikatan non-kovalen atau gaya kovalen lemah dan dapat dilepaskan dari enzim dengan cara pengenceran, filtrasi gel atau dialisis. Ada dua tipe utama inhibisi reversibel, yaitu (King, 1994; Ophardt, 2003) :

2.7.1.1 Inhibisi *Reversibel* Kompetitif

Inhibisi *reversibel* kompetitif terjadi apabila obat yang berperan sebagai inhibitor dengan struktur yang menyerupai substrat normal enzim, berkompetisi dengan substrat normal untuk berikatan pada sisi aktif enzim (King, 1994).

2.7.1.2 Inhibisi *Reversibel* Nonkompetitif

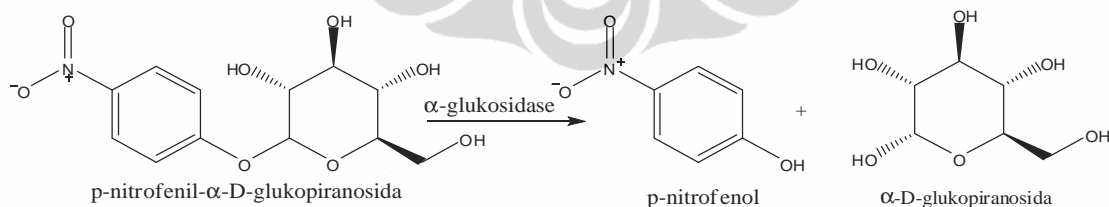
Pada inhibisi *reversibel* nonkompetitif, obat sebagai inhibitor tidak terikat pada sisi aktif enzim, tetapi terikat pada bagian lain dari enzim. Terikatnya inhibitor obat pada enzim, menyebabkan perubahan bentuk enzim yang mengakibatkan penurunan aktivitas katalik enzim. Karena inhibitor terikat pada sisi yang berbeda dari substrat maka enzim dapat berikatan dengan inhibitor dan substrat secara bersama-sama (King, 1994).

2.7.2 Inhibisi *Irreversibel*

Pada inhibisi *irreversibel*, inhibitor terikat secara kovalen pada sisi aktif enzim, membentuk kompleks enzim inhibitor yang bersifat tetap. Inhibitor *irreversibel* tidak dapat dilepaskan dari enzim dengan cara pengenceran maupun dialisis (King, 1994).

2.8 Uji Inhibisi •-Glukosidase

Reaksi •-glukosidase di dalam tubuh dengan substrat karbohidrat yang dipecah menjadi disakarida dan oligosakarida, proses ini lebih khusus lagi terjadi pada hidrolisis •-glukopiranosida, menghasilkan •-D-glukose dari gula non reduksi (Dewi *et al.*, 2007). Pada pengujian *in vitro*, enzim •-glukosidase akan menghidrolisis substrat *p*-nitrofenil-•-D-glukopiranosida menjadi *p*-nitrofenol (berwarna kuning) dan glukosa dengan reaksi sebagai berikut :



[Sumber : Sugiwati, Setiasi & Afifah, 2009]

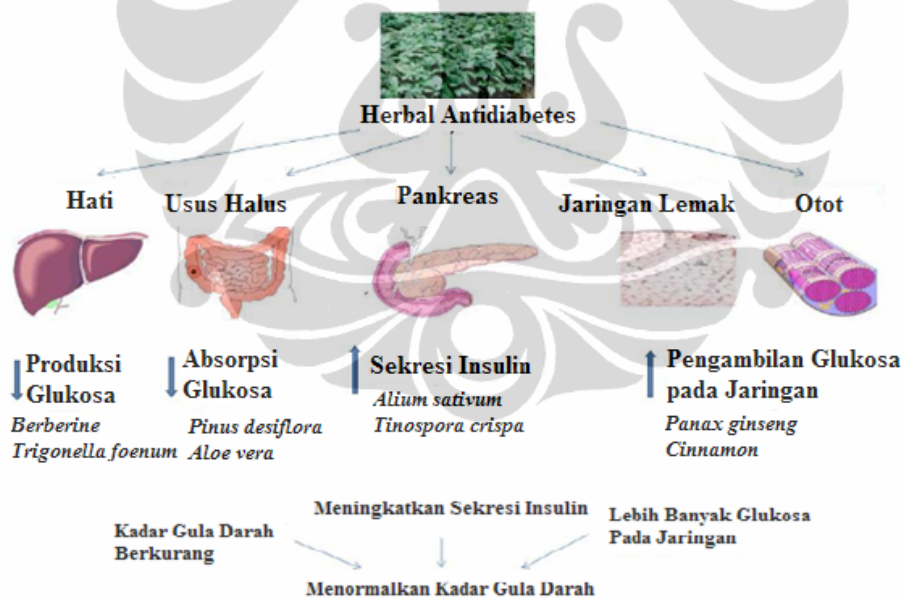
Gambar 2.5 Persamaan reaksi enzimatik •-glukosidase dan *p*-nitrofenil-•-D-glukopiranosida

Aktivitas enzim diukur berdasarkan hasil absorbansi *p*-nitrofenol. Apabila tumbuhan memiliki kemampuan menghambat enzim •-glukosidase maka *p*-nitrofenol yang dihasilkan akan berkurang (Basuki *et al.*, 2002).

2.9 Tanaman Obat Antidiabetes

Banyak tanaman obat telah diteliti secara ilmiah mengenai aktivitasnya sebagai antidiabetes, meliputi aktivitas sebagai inhibitor α -glukosidase, menginduksi sekresi insulin dan memperbaiki fungsi insulin (Hongxiang, Tang & Liang, 2009). Beberapa tanaman obat tersebut ada yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor α -glukosidase seperti *A. calamus* L. (Mei, S *et al.*, 2010), *Pinus desiflora* (Kim, *et al.*, 2005), *Punica granatum* (Li, *et al.*, 2005) dan *Aloe vera* (Hongxiang, Tang & Liang, 2009). Selain itu ada juga yang memiliki aktivitas memperbaiki fungsi insulin seperti *A. calamus* L. (Hao, S *et al.*, 2009), *Trigonella foenum*, *Cinnamon* dan *Berberine*. *Alium sativum* dan *Tinospora crispa* adalah contoh tanaman yang memiliki aktivitas merangsang produksi insulin (Hongxiang, Tang & Liang, 2009).

Gambar 2.6 memperlihatkan tempat aksi beberapa tanaman pada pengobatan diabetes.



[Sumber : Hongxiang, Tang & Liang, 2009]

Gambar 2.6 Tempat aksi beberapa tanaman pada pengobatan diabetes

2.10 Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Zat-zat aktif terdapat di dalam sel, namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dengan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya (Ditjen POM, 1986).

Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harborne, 1987).

Terdapat beberapa cara ekstraksi yaitu : (Ditjen POM, 1986)

2.10.1 Ekstraksi Secara Soxhletasi

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya ekstraksi secara berkesinambungan. Cairan penyari dipanaskan sampai mendidih. Uap penyari akan naik melalui pipa samping, kemudian diembunkan lagi oleh pendingin tegak. Cairan penyari turun untuk menyari zat aktif dalam simplisia. Selanjutnya bila cairan penyari mencapai pipa sifon, maka seluruh cairan akan turun ke labu alas bulat dan terjadi proses sirkulasi. Demikian seterusnya sampai zat aktif yang terdapat dalam simplisia tersari seluruhnya yang ditandai jernihnya cairan yang lewat pada tabung sifon.

2.10.2 Ekstraksi Secara Perkolasi

Perkolasi dilakukan dengan cara dibasahkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok, menggunakan 2,5 bagian sampai 5 bagian cairan penyari dimasukkan dalam bejana tertutup sekurang-kurangnya 3 jam. Massa dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam perkolator, ditambahkan cairan penyari. Perkolator ditutup dibiarkan selama 24 jam, kemudian kran dibuka dengan kecepatan 1 mL permenit, sehingga simplisia tetap terendam. Filtrat dipindahkan ke dalam bejana, ditutup dan dibiarkan selama 2 hari pada tempat terlindung dari cahaya.

2.10.3 Ekstraksi Secara Maserasi

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat yang cocok ke dalam bejana, kemudian dituangi dengan penyari 75

bagian, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil diaduk sekali-kali setiap hari lalu diperas dan ampasnya dimaserasi kembali dengan cairan penyari. Penyarian diakhiri setelah pelarut tidak berwarna lagi, lalu dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan pada tempat yang tidak bercahaya, setelah lima hari lalu endapan dipisahkan.

2.10.4 Ekstraksi Secara Refluks

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan. Bahan yang akan diekstraksi direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat pendingin tegak, lalu dipanaskan sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan diembunkan dengan pendingin tegak dan akan kembali menyari zat aktif dalam simplisia tersebut, demikian seterusnya. Ekstraksi ini biasanya dilakukan 3 kali dan setiap kali diekstraksi selama 4 jam.

2.10.5 Ekstraksi Dengan Penyulingan Uap Air

Penyulingan dapat dipertimbangkan untuk menyari serbuk simplisia yang mengandung komponen kimia yang mempunyai titik didih yang tinggi pada tekanan udara normal, yang pada pemanasan biasanya terjadi kerusakan zat aktifnya. Untuk mencegah hal tersebut, maka penyari dilakukan dengan penyulingan (Ditjen POM, 1986; Harborne, 1987).

2.11 Kromatografi

Isolasi adalah proses pemisahan komponen kimia yang terdapat dalam suatu ekstrak. Pemisahan ini didasarkan pada sifat adsorpsi dan partisi dari senyawa yang dipisahkan terhadap adsorban dan cairan pengelusi yang digunakan, proses isolasi biasanya dilakukan dengan cara kromatografi. Pemisahan terjadi karena komponen cuplikan bergerak dengan jarak yang berbeda akibat adanya perbedaan partisi dari komponen yang dipisahkan. Pemisahan dan pemurnian komponen terjadi karena adanya perbedaan distribusi di antara dua fase, fase diam dan fase gerak (Harborne, 1987).

Teknik kromatografi yang sering digunakan yaitu kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis, kromatografi kertas dan kromatografi gas. Sebagai adsorban selain kertas digunakan juga zat penjerap berpori misalnya aluminium

oksida, silika gel, dan selulosa. Kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis umumnya digunakan untuk identifikasi, karena cara ini khas dan mudah dilakukan untuk senyawa yang mudah menguap dan untuk identifikasi dan penetapan kadar, sedangkan kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan senyawa dalam jumlah yang lebih banyak (Harborne, 1987).

Jenis kromatografi lainnya adalah sebagai berikut :

2.11.1 Kromatografi Cair (*Liquid Chromatography*)

Kromatografi cair merupakan teknik yang tepat untuk memisahkan ion atau molekul yang terlarut dalam suatu larutan. Jika larutan sampel berinteraksi dengan fase stasioner, maka molekul-molekul didalamnya berinteraksi dengan fase stasioner; namun interaksinya berbeda dikarenakan perbedaan daya serap (*adsorption*), pertukaran ion (*ion exchange*), partisi (*partitioning*), atau ukuran. Perbedaan ini membuat komponen terpisah satu dengan yang lain dan dapat dilihat perbedaannya dari lamanya waktu transit komponen tersebut melewati kolom. Terdapat beberapa jenis kromatografi cair, diantaranya: *reverse phase chromatography*, *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, *size exclusion chromatography*, serta *supercritical fluid chromatography* (Tissue, 2000; Carrier, Bordanaro & Yip, 1997).

2.11.2 *Reverse phase chromatography*

Reverse phase chromatography merupakan alat analitikal yang kuat dengan memadukan sifat hidrofobik serta rendahnya polaritas fase stasioner yang terikat secara kimia pada padatan inert seperti silika. Metode ini biasa digunakan untuk proses ekstraksi dan pemisahan senyawa yang tidak mudah menguap (*non-volatile*) (Carrier, Bordanaro & Yip, 1997).

2.11.3 *High performance liquid chromatography*

High performance liquid chromatography (HPLC) mempunyai prinsip yang mirip dengan *reverse phase*. Hanya saja dalam metode ini, digunakan tekanan dan kecepatan yang tinggi. Kolom yang digunakan dalam HPLC lebih pendek dan berdiameter kecil, namun dapat menghasilkan beberapa tingkatan equilibrium dalam jumlah besar (Carrier, Bordanaro & Yip, 1997).

2.11.4 Size exclusion chromatography

Size exclusion chromatography, atau yang dikenal juga dengan *gel permeation* atau *filtration chromatography* biasa digunakan untuk memisahkan dan memurnikan protein. Metode ini tidak melibatkan berbagai macam penyerapan dan sangat cepat. Perangkat kromatografi berupa gel berpori yang dapat memisahkan molekul besar dan molekul kecil. Molekul besar akan terelusi terlebih dahulu karena molekul tersebut tidak dapat penetrasi pada pori-pori (Carrier, Bordanaro & Yip, 1997).

2.11.5 Kromatografi Pertukaran Ion (*Ion-Exchange Chromatography*)

Kromatografi pertukaran ion (*ion-exchange chromatography*) biasa digunakan untuk pemurnian materi biologis, seperti asam amino, peptida, protein. Metode ini dapat dilakukan dalam dua tipe, yaitu dalam kolom maupun ruang datar (*planar*). Terdapat dua tipe pertukaran ion, yaitu pertukaran kation (*cation exchange*) dan pertukaran anion (*anion exchange*). Pada pertukaran kation, fase stasioner bermuatan negatif, sedangkan pada pertukaran anion, fase stasioner bermuatan positif. Molekul bermuatan yang berada pada fase cair akan melewati kolom. Jika muatan pada molekul sama dengan kolom, maka molekul tersebut akan terelusi. Namun jika muatan pada molekul tidak sama dengan kolom, maka molekul tersebut akan membentuk ikatan ionik dengan kolom. Untuk mengelusi molekul yang ada pada kolom diperlukan penambahan larutan dengan pH dan kekuatan ionik tertentu. Pemisahan dengan metode ini sangat selektif dan karena biaya untuk menjalankan metode ini murah serta kapasitasnya tinggi, maka metode ini biasa digunakan pada awal proses keseluruhan (Hargreaves, 2010).

2.12 Metode Identifikasi

Identifikasi dapat dilakukan jika telah didapatkan senyawa murni yang telah diuji kemurniannya dengan kromatografi lapis tipis dan kristalisasi. Identifikasi dilakukan dengan analisis data spektroskopi. Spektroskopi adalah suatu studi mengenai interaksi antara energi cahaya dengan materi. Warna yang tampak adalah akibat adsorpsi energi cahaya oleh senyawa organik maupun anorganik. Panjang gelombang pada suatu senyawa tergantung dari struktur senyawa tersebut, maka teknik-teknik spektroskopi dapat digunakan untuk

menentukan adanya struktur senyawa yang belum diketahui dan mempelajari karakteristik suatu senyawa (Silverstein, Webster & Kimble, 2005).

Data spektroskopi memberikan informasi spektrum untuk menentukan struktur kimia dari suatu senyawa, misalnya spektroskopi resonansi magnetik inti memberikan keterangan tentang jumlah proton dan karbon, kedudukan karbon dan tipe proton dan molekul. Spektroskopi infra merah memberikan informasi spektrum gugus fungsional suatu senyawa. Dua molekul senyawa kimia yang berbeda struktur kimianya akan berbeda pula spektrumnya. Hal ini dapat dimengerti karena macam ikatan yang berbeda, frekwensi vibrasinya tidak sama. Spektroskopi massa memberikan keterangan tentang hasil fragmentasi senyawa yang dinyatakan sebagai rasio massa dengan muatan (m/e) yang merupakan gabungan kesatuan yang tidak terpisahkan untuk menentukan struktur senyawa yang akan dianalisa (Silverstein, Webster & Kimble, 2005).

Spektroskopi massa adalah suatu instrumen yang dapat menyeleksi molekul-molekul gas bermuatan berdasarkan massa atau beratnya. Teknik ini tidak dapat dilakukan dengan spektroskopi, akan tetapi nama spektroskopi dipilih disebabkan persamaannya dengan pencatat fotografi dan spektrum garis optik. Umumnya spektrum massa diperoleh dengan mengubah senyawa suatu sampel menjadi ion-ion yang bergerak cepat yang dipisahkan berdasarkan perbandingan massa terhadap muatan. Proses ionisasi menghasilkan partikel-partikel bermuatan positif, dimana massa terdistribusi adalah spesifik terhadap senyawa induk. (Silverstein, Webster & Kimble, 2005).

Jika didapat data IR dan NMR yang cukup lengkap, maka MS ini dapat digunakan untuk konfirmasi bobot molekul dan kemungkinan rumus strukturnya. Aturan nitrogen dapat dimanfaatkan untuk membantu penentuan rumus ini. Lazimnya semua senyawa organik mempunyai berat molekul genap tidak mengandung nitrogen atau mengandung sejumlah atom nitrogen yang genap, sedang semua senyawa organik dengan berat molekul ganjil mengandung jumlah atom nitrogen ganjil. Aturan ini berlaku untuk senyawa-senyawa kovalen yang mengandung C, H, O, S, dan Halogen. Pola fragmen dipergunakan untuk mengidentifikasi senyawa, juga memungkinkan terdapat pengenalan gugus fungsi dengan melihat fragmentasi spesifik (Silverstein, Webster & Kimble, 2005).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan Agustus 2009 - Agustus 2010, di Laboratorium Kimia Bahan Alam Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, kawasan Pusat Penelitian Ilmu dan Teknologi, Serpong.

3.2 Bahan

3.2.1 Rimpang

Bagian tanaman yang diteliti adalah rimpang *Acorus calamus* L. yang diperoleh dari Solo dan telah diidentifikasi di Herbarium Bogoriensis, Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

3.2.2 Bahan Kimia

Air suling, bovine serum albumin (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Jepang) dapar fosfat pH 7, dikorometana (teknis), dimetil sulfoksida (Merck cat. 3.17275, Jerman), enzim α -glukosidase (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Jepang), ekstrak koji, etanol (teknis), etil asetat (teknis), metanol (teknis), *n*-butanol (teknis), *n*-heksana (teknis), lempeng KLT (Merck cat. 1.05554, Jerman), resin Diaion HP-20 (Mitsubishi-Chemical, Jepang), silika gel (Merck cat. 1.07734, Jerman), Sephadex LH-20 (Amersham Bioscience, Swedia), paranitrofenil α -D-glukopiranosida (Wako Pure Chemical Industries Ltd. EC 3.2.1.20, Jepang), Na₂CO₃ (Merck cat. 1.09940, Jerman).

3.3 Alat

Alat penggiling, Bejana maserasi, peralatan kromatografi kolom, peralatan kromatografi lapis tipis, pengaduk listrik (Thermo Science, USA), penguap putar (*rotary evaporator*) (Buchi R-215, Jerman), spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U 2000, Jepang), spektrofotometer infra merah (Shimadzu IR Prestige 21, Jepang), spektrometer resonansi magnetik inti (Jeol JNM-ECA 500 MHz, USA), spektrometer GC-MS (Perkin Elmer Clarus 5000, USA).

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Ekstraksi

Sebanyak 20,06 kg serbuk kering rimpang *A. calamus* L. dimasukkan ke dalam bejana maserasi kemudian ditambahkan ke dalamnya 100 L metanol hingga merendam serbuk, dan selanjutnya dibiarkan dalam bejana maserasi selama 5 hari. Pada hari ke-lima cairan penyari dipisahkan dari ampas dan disimpan dalam wadah penampungan. Selanjutnya ampas diekstraksi kembali dengan cara yang sama selama 5 hari. Ekstrak cair yang diperoleh dikumpulkan menjadi satu dan dipekatkan dengan menggunakan penguap putar pada suhu 55°C, hingga diperoleh 1,406 kg ekstrak kental.

3.4.2 Partisi

Ekstrak kental yang diperoleh dipartisi dengan cara menimbang 1,3 kg ekstrak dan dilarutkan ke dalam 1,3 L air suling, kemudian ditambahkan 1,3 L *n*-heksana lalu diaduk menggunakan pengaduk listrik. Setelah pengadukan selesai, akan diperoleh dua lapisan yang tidak bercampur, lapisan air dipisahkan dari *n*-heksana. Selanjutnya pada fraksi air ditambahkan lagi dengan 1,3 L *n*-heksana yang baru dan kembali diaduk menggunakan pengaduk listrik. Proses ini diulang sebanyak 3 kali, fraksi *n*-heksana yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan penguap putar vakum pada suhu 45°C hingga diperoleh ekstrak kental.

Partisi dilanjutkan dengan menambah 1300 mL etil asetat pada fraksi air dengan 6 kali pengulangan dan 1300 mL *n*-butanol sebanyak 7 kali pengulangan. Hasil partisi yang diperoleh selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.1.

3.4.3 Kolom Kromatografi

Sebanyak 15 gram ekstrak *n*-butanol diisolasi dengan menggunakan kolom kromatografi (panjang 75 cm dan diameter 4,5 cm) dengan fase diam resin (Diaion HP-20) sebanyak 900 g. Resin yang telah direndam dalam etanol 100% dimasukkan ke dalam kolom menggunakan corong kaca hingga memenuhi $\frac{3}{4}$ panjang kolom. Resin kemudian dielus menggunakan etanol 100%, proses ini dihentikan apabila eluat yang keluar telah jernih.

Kran kolom ditutup dan ditambahkan ke dalamnya etanol 100% hingga memenuhi kolom, kondisi ini dibiarkan selama semalam, setelah itu etanol

dialirkan hingga habis dan eluen diganti dengan air suling. Elusi dengan air suling dilakukan sebanyak 4x volume kolom. Pada elusi yang terakhir air suling disisakan kira-kira 3 cm di atas permukaan resin. Sampel dimasukkan ke dalam kolom dan di atasnya ditambahkan resin sampai menutupi keseluruhan permukaan sampel. Kran kolom ditutup dan ditambahkan kedalamnya air suling hingga memenuhi kolom, kondisi ini dibiarkan selama semalam.

Elusi pada ekstrak dilakukan dengan menggunakan eluen etanol : air suling dalam berbagai perbandingan (0%:100%; 25%:75%; 50%:50%; 75%:25%; 100%:0%) elusi dimulai pada eluen dengan perbandingan etanol : air suling 0%:100%, perbandingan eluen diganti apabila eluat telah bening dan dilanjutkan pada perbandingan eluen selanjutnya, demikian proses ini berlangsung hingga pada eluen dengan perbandingan etanol : air suling 100%:0%.

Proses kolom kromatografi menggunakan resin diulang sekali lagi pada ukuran kolom dan jumlah sampel yang sama. Untuk memperbanyak sampel digunakan kolom yang lebih besar, dengan panjang 1000 cm dan diameter 7,5 cm dengan sampel 35 gram dan resin 2000 g. Hasil kolom kromatografi dengan fase diam resin selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Hasil fraksinasi dengan kolom resin (fraksi I-V) dilakukan uji aktivitas terhadap \bullet -glukosidase. Dari hasil uji aktivitas tersebut diperoleh data seperti pada tabel 4.4. Selanjutnya dilakukan pemurnian pada fraksi yang aktif (fraksi V) sebanyak 1000 mg menggunakan kromatografi kolom (panjang = 50 cm; diameter 1,5 cm) dengan fase diam Sephadex LH-20 dan fase gerak dikorometana : metanol (1 : 1). Hasil isolasi yang diperoleh selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Isolat aktif (isolat III) sebanyak 30 mg yang diperoleh dari proses ini dimurnikan dengan menggunakan kromatografi kolom (panjang = 50 cm; diameter 1,5 cm) dengan fase gerak dikorometana : metanol (95:5) menghasilkan senyawa murni AFB (Acorus Fraksi Butanol) sebanyak 9,8 mg.

3.4.4 Uji Efek Inhibisi \bullet -Glukosidase

Uji efek inhibisi \bullet -glukosidase dilakukan pada ekstrak *n*-butanol dan fraksi air, setelah itu dilanjutkan pada tiap isolat yang diperoleh.

3.4.4.1 Penyipapan Ekstrak

Ekstrak ditimbang sebanyak 2 mg dan dilarutkan dengan 200 μ L dimetil sulfoksida (DMSO) hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 1%. Larutan ekstrak 1% di pipet 100 μ L dan ditambahkan dengan 100 μ L dimetil sulfoksida hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 0,5% demikian selanjutnya hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 0,25 % dan 0,125 %.

3.4.4.2 Penyiapan Enzim

Larutan enzim dibuat dengan melarutkan 1,0 mg α -glukosidase dalam 100 ml dapar fosfat pH 7 yang mengandung 200 mg bovine serum albumin. Sebelum digunakan sebanyak 1 mL larutan enzim tersebut diencerkan 25 kali dengan dapar fosfat pH 7.

3.4.4.3 Pengujian Blangko

Blangko 5 μ L DMSO ditambah dengan 495 μ L dapar fosfat pH 7 dan 250 μ L 20 mM p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP), diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam sampel ditambahkan 250 μ L enzim yang telah diencerkan, sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 1000 μ L 200 mM Na_2CO_3 . Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

3.4.4.4 Pengujian Sampel

Sampel 5 μ L larutan ekstrak ditambah dengan 495 μ L dapar fosfat pH 7 dan 250 μ L 20 mM p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP), diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam sampel ditambahkan 250 μ L enzim yang telah diencerkan, sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 1000 μ L 200 mM Na_2CO_3 . Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

3.4.4.5 Pengujian Sampel Tanpa Enzim

Sampel 5 μ L larutan ekstrak ditambah dengan 495 μ L dapar fosfat pH 7 dan 250 μ L 20 mM p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP), sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam sampel ditambahkan 250 μ L dapar

fosfat pH 7 100 mM, sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 1000 µL 200 mM Na₂CO₃. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm. Sebagai kontrol positif digunakan ekstrak koji. Sistem reaksi selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Sistem reaksi uji inhibisi • -glukosidase

	Blangko (•L)	So(•L)	S1(•L)
Sampel	-	5	5
DMSO	5	-	-
Dapar	495	495	495
PNP	250	250	250
Inkubasi (37°C)	5 menit		
Dapar	-	250	-
Enzim	250	-	250
Inkubasi (37°C)	15 menit		
Natrium Karbonat	1000	1000	1000

Keterangan: So = Sampel tanpa enzim
S1 = Sampel dengan enzim

3.4.4.6 Perhitungan Persen Inhibisi Dan IC₅₀

% Inhibisi dihitung dengan rumus :

$$\frac{\text{Absorban Blangko}-\text{Absorban Sampel}}{\text{Absorban Blangko}} \times 100\% \quad (3.1)$$

IC₅₀ 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

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b} \quad (3.2)$$

3.4.4.7 Penentuan Kinetika Inhibisi Enzim

Penentuan kinetika inhibisi enzim diukur dengan meningkatkan konsentrasi p-nitrofenil • -D-glukopiranosida sebagai substrat dengan konsenrasi 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM dan 20 mM dengan menggunakan ekstrak pada konsentrasi 6,25 ppm, 12,5 ppm dan 25 ppm. Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data menggunakan metode *Lineweaver-Burk* untuk memperoleh tetapan

kinetika Michaelis-Menten (Dewi *et al.*, 2007). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.6. Tetapan kinetika Michaelis-Menten dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = a + b x$, dimana x adalah jumlah substrat dan y adalah absorbansi sampel.

Sehingga $y = 0 \Rightarrow x = -1/K_M$

$$y = a + b (-1/K_M) \Rightarrow K_M = b/a \quad (3.4)$$

3.4.5 Identifikasi Senyawa Aktif Antidiabetes

Senyawa AFB (Acorus Fraksi Butanol) diidentifikasi dengan menganalisis data spektroskopi dari spektrofotometri UV-Visible, IR, MS, spektroskopi resonansi magnetik inti proton ($^1\text{H-NMR}$) dan karbon ($^{13}\text{C-NMR}$) serta teknik NMR-2D yang meliputi HMQC dan HMBC.

3.4.5.1 Pemeriksaan Spektrum Ultraviolet

Pemeriksaan dilakukan dengan alat spektrometer UV-Vis Hitachi U-2000, yaitu dengan melarutkan 2 mg sampel dalam DMSO sampai 2 ml sehingga konsentrasi sampel menjadi 1000 $\mu\text{g/ml}$. Sampel dincerkan hingga diperoleh konsentrasi 10, 5, 2, atau 1 $\mu\text{g/ml}$ (pilih konsentrasi yang memberikan nilai adsorban 0,2-0,8) Kemudian konsentrasi terpilih dimasukkan kedalam kuvet, pelarut dimasukkan pada kuvet lain dan diukur absorbansinya secara bersamaan.

3.4.5.2 Pemeriksaan Spektrum Infra Merah (IR)

Menggunakan alat spektrofotometer Shimadzu IR Prestige 21, yaitu dengan menggerus sejumlah 1 mg sampel dengan 100 mg KBr secara homogen. Campuran dikempa dengan kekuatan 10 ton/cm^3 sehingga terbentuk sebuah pelet yang tipis dan transparan, kemudian diukur serapan infra merahnya.

3.4.5.3 Pemeriksaan Spektrum Resonansi Magnetik Inti (NMR)

Sebanyak 6,2 mg sampel dilarutkan dalam DMSO, kemudian dimasukkan ke dalam tabung kaca yang diletakkan ditengah tangki medan magnet yang berisi gas Helium dan disekat dengan Nitrogen cair. Alat dijalankan selama 2 x 24 jam dan data yang diperoleh diolah dengan menggunakan program *Delta NMR software*. Dari hasil pengolahan data akan diperoleh spektrum spektrum resonansi magnetik inti proton ($^1\text{H-NMR}$), karbon ($^{13}\text{C-NMR}$), teknik NMR-2D yang meliputi HMQC, HMBC dan DEPT $^{13}\text{C-NMR}$.

3.4.5.4 Pemeriksaan Spektrum Massa dengan GC-MS

Sebanyak 1 mg senyawa ditimbang dan dilarutkan dalam metanol. Diambil 10 μ l sampel dan disuntikkan pada GC-MS Perkin Elmer Clarus 5000 melalui kolom Heliflex AT-5 ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m kecepatan alir 0,5 ml/menit.



BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Ekstraksi Dan Partisi

Hasil ekstraksi 20,6 kg serbuk *A. calamus* L. menggunakan 200 L metanol diperoleh ekstrak metanol kental 1,406 kg dan partisi 1,300 kg ekstrak metanol kental dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol diperoleh data seperti pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil partisi serbuk *A. calamus* L.

Esktrak	Hasil (g)	Jumlah Penyarian	Jumlah Pelarut (L)	Rendemen (%)
<i>n</i> -heksana	128	3x	1,3	9,85
etil asetat	63	6x	1,3	4,85
<i>n</i> -butanol	123	7x	1,3	9,46

4.1.2 Kolom Kromatografi

Hasil isolasi 65 gram ekstrak *n*-butanol menggunakan metode kolom kromatografi dengan fase diam resin diperoleh data seperti pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil isolasi kolom kromatografi dengan fase diam resin

No	Fraksi	Eluen	Jumlah (mg)
1.	I	Etanol : Air Suling (0%:100%)	20171,8
2.	II	Etanol : Air Suling (25%:75%)	4444,4
3.	III	Etanol : Air Suling (50%:50%)	7343,5
4.	IV	Etanol : Air Suling (75%:25%)	5286,9
5.	V	Etanol : Air Suling (100%:0%)	1033,2

Hasil fraksinasi dengan kolom resin (fraksi I-V) dilakukan uji aktivitas terhadap α -glukosidase. Dari hasil uji aktivitas tersebut diperoleh data seperti pada tabel 4.4 Selanjutnya dilakukan pemurnian pada fraksi yang aktif (fraksi V) sebanyak 1000 mg menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam Sephadex LH-20 dan fase gerak diklorometana : metanol (1:1). Hasil isolasi yang diperoleh selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil isolasi kolom kromatografi dengan fase diam Sephadex LH-20

No	Isolat	Eluen	Jumlah (mg)
1.	I	Diklorometana : Metanol (1:1)	279,5
2.	II	Diklorometana : Metanol (1:1)	285,2
3.	III	Diklorometana : Metanol (1:1)	40,6
4.	IV	Diklorometana : Metanol (1:1)	49,2
5.	V	Diklorometana : Metanol (1:1)	26,2

Isolat aktif antidiabetes (isolat III) sebanyak 30 mg yang diperoleh dari proses ini dimurnikan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan fase gerak diklorometana : metanol (95:5) hasilnya diperoleh senyawa murni AFB (Acorus Fraksi Butanol) sebanyak 9,8 mg.

4.1.3 Uji Efek Inhibisi • -Glukosidase

Hasil pengujian efek inhibisi • -glukosidase pada ekstrak *n*-butanol, fraksi air dan fraksi hasil kolom kromatografi dengan fase diam resin dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil pengujian efek inhibisi • -glukosidase ekstrak *n*-butanol, ekstrak air dan fraksi hasil kolom dengan fase diam resin

No	Sampel	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Inhibisi (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1.	Blangko	1,668	-	-	-
2.	Standar (Koji)	0,074	25,000	95,564	3,78
		0,279	12,500	83,273	
		0,683	6,250	59,053	
		0,890	3,125	46,643	
3.	Fraksi <i>n</i> -butanol	1,643	25,000	1,499	2,74.10 ⁹
		1,649	12,500	1,139	
		1,703	6,250	-2,098	
		1,715	3,125	-2,818	
4.	Fraksi Air	1,669	25,000	-0,060	5,30.10 ⁴
		1,618	12,500	2,998	
		1,587	6,250	4,856	
		1,743	3,125	-4,496	
5.	Fraksi I	1,691	25,000	-1,379	8,25.10 ³³
		1,718	12,500	-2,998	
		1,676	6,250	-0,480	
		1,660	3,125	0,480	

Tabel 4.4 (lanjutan)

No	Sampel	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Inhibisi (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
6.	Fraksi II	1,681	25,000	-0,779	-2,02.10 ²
		1,674	12,500	-0,360	
		1,600	6,250	4,077	
		1,641	3,125	1,619	
7.	Fraksi III	1,610	25,000	3,477	2,84.10 ⁴
		1,688	12,500	-1,199	
		1,763	6,250	-5,695	
		1,650	3,125	1,079	
8.	Fraksi IV	1,526	25,000	8,513	7,38.10 ⁴
		1,530	12,500	8,273	
		1,611	6,250	3,417	
		1,651	3,125	1,019	
9.	Fraksi V	0,058	25,000	96,523	4,87
		0,064	12,500	96,163	
		0,498	6,250	70,144	
		1,292	3,125	22,542	

Hasil pengujian efek inhibisi α -glukosidase pada isolat hasil kolom kromatografi dengan fase diam Sephadex LH-20 dan Senyawa AFB dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Hasil pengujian efek inhibisi α -glukosidase isolat hasil fraksinasi dengan fase diam Sephadex LH-20 dan senyawa AFB

No	Sampel	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Inhibisi (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1.	Blangko	2,010	-	-	-
2.	Standar (Koji)	0,036	25,000	95,564	4,01
		0,257	12,500	83,273	
		0,379	6,250	59,053	
		1,411	3,125	46,643	
3.	Isolat I	1,926	25,000	4,179	4,4.10 ⁹
		1,942	12,500	3,383	
		1,978	6,250	1,592	
		2,025	3,125	-0,746	
4.	Isolat II	1,800	25,000	10,448	83,92
		2,012	12,500	-0,100	
		2,046	6,250	-0,791	
		2,027	3,125	-0,846	

Tabel 4.5 (Lanjutan)

No	Sampel	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Inhibisi (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
5.	Isolat III	1,081	25,000	46,219	28,76
		1,948	12,500	3,085	
		1,973	6,250	1,841	
		2,041	3,125	-1,542	
6.	Isolat IV	1,936	25,000	3,682	-2,35
		1,997	12,500	0,647	
		1,689	6,250	15,970	
		1,974	3,125	1,791	
7.	Isolat V	1,956	25,000	2,687	-28,70
		1,738	12,500	13,532	
		1,422	6,250	29,254	
		1,709	3,125	14,975	
8.	AFB	0,115	25,000	71,605	17,89
		0,288	12,500	28,889	
		0,300	6,250	25,926	
		0,398	3,125	1,728	

4.1.4 Penentuan Kinetika Inhibisi Enzim

Data hasil penentuan kinetika inhibisi enzim dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Data kinetika inhibisi enzim

Konsentrasi PNP(mM) (S)	Absorbansi Sampel (V)				1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
	V1	V2	V3	V4					
20	1,583	0,299	1,216	1,500	0,050	0,632	3,344	0,822	0,667
10	1,821	0,165	0,334	0,252	0,100	0,549	6,061	2,994	3,968
5	1,133	0,107	0,363	0,117	0,200	0,883	9,346	2,755	8,547
2,5	1,139	0,166	0,126	0,069	0,400	0,878	6,024	7,937	14,493
1,25	0,568	0,074	0,107	0,055	0,800	1,761	13,514	9,346	18,182

Keterangan :

V1 = tanpa inhibitor (DMSO)

V2 = konsentrasi sampel 25 ppm

V3 = konsentrasi sampel 12,5 ppm

V4 = konsentrasi sampel 6,25 ppm

Dengan menggunakan persamaan regresi linear dimana 1/S sebagai sumbu x dan 1/V adalah sumbu y, akan diperoleh tetapan Michaelis-Menten pada masing-masing konsentrasi menggunakan rumus (3.4). Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten

Sampel	a	b	r	K _M
V1	0,543	1,362	0,911	2,508
V2	4,567	10,84	0,915	2,374
V3	1,980	9,793	0,840	4,946
V4	3,823	18,960	0,838	4,959

Keterangan :

V1 = tanpa inhibitor (DMSO)

V2 = konsentrasi sampel 25 ppm

V3 = konsentrasi sampel 12,5 ppm

V4 = konsentrasi sampel 6,25 ppm

4.1.5 Identifikasi Senyawa AFB (Acorus Fraksi Butanol)

Senyawa AFB (Acorus Fraksi Butanol) berupa serbuk berwarna putih dengan titik leleh 140°C. Panjang gelombang maksimum dari hasil pengukuran spektrofotometer UV-Vis adalah 252 nm, dari data spektrum infra merah (IR) memberikan pita serapan yang spesifik pada daerah bilangan gelombang $\nu = 1722,43 \text{ cm}^{-1}$, $\nu = 2926,01 \text{ cm}^{-1}$, $\nu = 1606,77 \text{ cm}^{-1}$ dan $\nu = 827,46 \text{ cm}^{-1}$. Spektrum ¹H-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz), $\delta_{\text{H}} = 4,65 \text{ ppm}$ (s, 1H) dan 8,06 ppm (s, 2H). Spektrum ¹³C NMR (DMSO-D₆, 125 MHz) $\delta_{\text{C}} = 62,81 \text{ ppm}$ (C-2'), 129,56 ppm (C-2), 133,51 ppm (C-1) dan 164,74 ppm (C-1'). Data GC-MS menunjukkan bahwa senyawa tersebut mempunyai berat molekul [M] = 194 dengan rumus molekul C₁₀H₁₀O₄.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Ekstraksi dan Partisi

Ekstraksi pada serbuk *A. calamus* L. dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol. Penggunaan serbuk simplisia bertujuan untuk memperluas permukaan pada sampel yang akan diekstraksi sehingga memungkinkan untuk menyari komponen kimia yang ada pada sampel dalam jumlah yang lebih banyak (Ditjen POM, 1986). Metanol digunakan sebagai pelarut karena sifat polar yang dimiliki oleh pelarut ini sehingga penyarian akan lebih optimal dengan tersarinya sejumlah komponen kimia baik yang bersifat polar maupun yang bersifat nonpolar. Sesuai dengan hukum kelarutan *like dissolves like*, artinya kelarutan akan terjadi bila memiliki sifat kepolaran yang sama, metanol merupakan pelarut yang

universal, seperti halnya etanol yang dapat melarutkan metabolit-metabolit sekunder di dalam tumbuhan, pelarut metanol relatif lebih murah dibandingkan pelarut etanol (Harborne, 1987).

Partisi disebut juga sebagai ekstraksi cair-cair adalah proses pemisahan zat terlarut didalam 2 macam zat pelarut yang tidak saling bercampur atau dengan kata lain perbandingan konsentrasi zat terlarut dalam pelarut organik, dan pelarut air. Hasil partisi pada tiap pelarut menghasilkan jumlah penyarian dan ekstrak yang berbeda (Tabel 4.1), hal tersebut memungkinkan karena adanya sifat senyawa yang dapat terlarut dalam air dan ada pula senyawa yang dapat larut dalam pelarut organik (Rydberg & Cox, 2004), demikian pula terdapat perbedaan tingkat kelarutan senyawa pada tiap pelarut yang digunakan. Pada penelitian ini partisi dilakukan secara bertahap dari pelarut non polar hingga pada pelarut yang bersifat polar yaitu *n*-butanol, hal ini bertujuan untuk memisahkan senyawa sesuai dengan tingkat kelarutannya (Sarker, Latif & Grey, 2006).

4.2.2 Kolom Kromatografi

Proses kolom kromatografi dilakukan dengan beberapa tahap. Tahap pertama dengan menggunakan fase diam resin (Diaion HP-20) dengan eluen etanol : air suling dalam berbagai konsentrasi (Tabel 4.2). Penggunaan resin sebagai fase diam dilakukan karena sampel yang diisolasi merupakan ekstrak *n*-butanol dengan sifat kepolaran relatif tinggi. Penggunaan eluen etanol : air suling dalam berbagai perbandingan dimaksudkan agar fraksi memisah berdasarkan tingkat kepolaran masing-masing, mulai dari yang lebih polar menuju ke tingkat kurang polar (Dewi *et al*, 2007).

Setelah diperoleh fraksi yang aktif, tahap isolasi dilanjutkan dengan menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam Sephadex LH-20 dan eluen diklorometana : metanol (1:1) (Tabel 4.3). Penggunaan Sephadex LH-20 sebagai fase diam dilakukan untuk memperoleh isolat berdasarkan perbedaan berat molekul. Isolat aktif antidiabetes dari proses ini dimurnikan dengan metode kolom kromatografi dengan fase diam silika gel dan fase gerak diklorometana : metanol (95:5).

4.2.3 Uji Efek Inhibisi α -Glukosidase

Prinsip dasar pengujian ini adalah mengukur absorbansi dari *p*-nitrofenol yang merupakan produk dari reaksi *p*-nitrofenil α -D-glukopiranosida yang merupakan substrat dari α -glukosidase sesuai dengan reaksi pada Gambar 2.5 (Basuki *et al.*, 2002 & Dewi *et al.*, 2007), reaksi ini berlangsung secara *in vitro*, sementara di dalam tubuh yang berfungsi sebagai substrat adalah karbohidrat. Penggunaan inhibitor α -glukosidase sebagai antihiperqlikemik berdasarkan penghambatan kompetitif secara *reversible* terhadap enzim pencernaan karbohidrat yang ada pada usus halus seperti α -glukosidase (Koolman & Roehm, 2005), α -amilase, isomaltase, sucrase, dan maltase. Enzim-enzim ini berfungsi pada proses hidrolisis karbohidrat menjadi glukosa. Pada penderita diabetes inhibisi enzim tersebut menyebabkan terhambatnya absorpsi glukosa dan menurunkan hiperglikemia *post prandial* (Sugiwati, Setiawati & Afifah, 2009).

Pada pengujian ini digunakan koji sebagai standar, koji merupakan hasil metabolit dari *Aspergillus terreus* dimana hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa isolat ke-4 dari fraksi ke-10 ekstrak etil asetat dari koji memiliki IC_{50} 2,9 $\mu\text{g/mL}$ (Dewi *et al.*, 2007).

Uji efek inhibisi α -glukosidase pada sampel dilakukan secara bertahap dimulai dari ekstrak kasar (*crude extract*) hingga pada senyawa AFB. Pada pengujian ekstrak kasar terhadap fraksi larut air dan *n*-butanol tidak diperoleh adanya aktivitas penghambatan terhadap enzim dengan nilai IC_{50} masing-masing $5,30 \cdot 10^4$ $\mu\text{g/mL}$ dan $2,74 \cdot 10^9$ $\mu\text{g/mL}$, hal ini dimungkinkan karena konsentrasi senyawa aktif pada ekstrak kasar masih rendah dan belum terfraksinasi serta banyaknya komponen kimia yang kemungkinan terdapat pada ekstrak dan hanya sedikit yang memiliki efek (Hongxiang, Tang & Liang, 2009).

Hasil pengujian pada fraksi yang diperoleh dari proses isolasi ekstrak *n*-butanol menggunakan kolom resin menunjukkan adanya aktivitas penghambatan kerja enzim pada fraksi ke-lima dengan nilai IC_{50} 4,87 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 4.4). Berbeda dengan ekstrak kasar *n*-butanol yang tidak memiliki aktivitas penghambatan pada α -glukosidase, hal ini dapat dijelaskan bahwa komponen kimia yang memiliki efek telah terpisah menurut kelarutannya dan terdapat pada

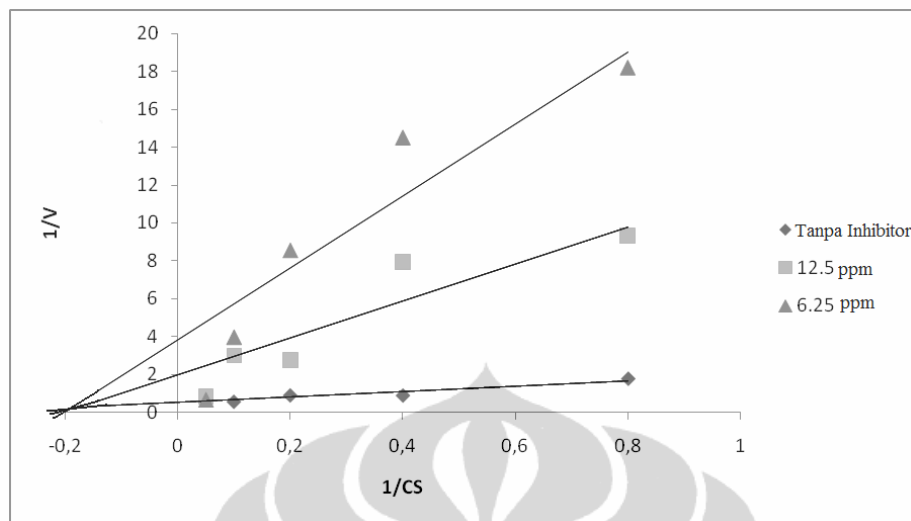
fraksi ke-lima. Hal ini dapat terjadi sebab tiap-tiap komponen kimia memiliki tingkat kelarutan yang berbeda (Sarker, Latif & Grey, 2006).

Pengujian dilakukan pada hasil isolasi menggunakan kolom kromatografi dengan Sephadex LH-20 pada fraksi ke-lima menunjukkan adanya penghambatan •-glukosidase pada isolat ke-tiga dengan nilai IC_{50} 28,76 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 4.5). Setelah diisolasi dan dilakukan pemurnian pada isolat ke-tiga, diperoleh senyawa AFB yaitu senyawa aktif penghambat aktivitas •-glukosidase dengan nilai IC_{50} 17,89 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} isolat ke-3 dan senyawa AFB lebih besar dari nilai IC_{50} fraksi ke-5 hal ini menunjukkan kemungkinan adanya interaksi antara komponen yang ada pada fraksi ke-5 yang menyebabkan nilai aktivitas inhibisi (IC_{50}) yang dimilikinya menjadi lebih kecil (Mei, *et al.*, 2010), sedangkan pada isolat ke-3 dan pada senyawa AFB terjadi hal yang sebaliknya (Dewi *et al.*, 2007).

Hasil pengujian menunjukkan adanya nilai minus (-) pada persen inhibisi dan nilai IC_{50} . Nilai (-) pada persen inhibisi disebabkan karena absorbansi sampel lebih besar dibandingkan absorbansi pada blangko sedangkan nilai (-) pada IC_{50} disebabkan karena nilai a (persamaan 3.2) hasil persamaan regresi lebih besar dari 50. Dari hasil pengujian fraksi ke-5, isolat ke-3 dan senyawa AFB dinyatakan aktif karena nilai $IC_{50} < 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$ (Dewi *et al.*, 2007) sedangkan nilai inhibisi pada 25 ppm dapat dinyatakan bahwa fraksi ke-5, isolat ke-3, dan senyawa AFB memiliki potensi inhibisi yang tinggi (>75%), rendah (< 50 %) dan sedang (40-75%) (Gholamhoseinian *et al.*, 2008).

4.2.4 Penentuan Kinetika Inhibisi Enzim

Berdasarkan pengolahan data pada Tabel 4.6 dapat dinyatakan bahwa kinetika inhibisi enzim pada fraksi aktif inhibitor •-glukosidase merupakan inhibisi yang bersifat non-kompetitif sesuai pada Gambar 4.1. Grafik menunjukkan bahwa titik potong (*intersept*) berada pada sumbu x dengan kemiringan (*slope*) yang sama, hal ini merupakan ciri dari kinetika inhibisi non kompetitif (Nelson & Cox, 2000).



Gambar 4.1 Grafik kinetika inhibisi enzim

4.2.5 Identifikasi Senyawa AFB (Acorus Fraksi Butanol)

4.2.5.1 Spektrum Uv-Vis

Panjang gelombang maksimum dari hasil pengukuran spektrofotometer UV-Vis senyawa AFB adalah 252 nm, hal ini menunjukkan adanya gugus kromofor dengan inti benzena tersubstitusi.

4.2.5.2 Spektrum Infra Merah (IR)

Spektrum FT-IR senyawa AFB pada bilangan gelombang $\bullet = 1722,43 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi ulur C=O, $\bullet = 2926,01 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi ulur =C-H- alifatik, $\bullet = 1722,43 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan ikatan C=O aromatis dan $\bullet = 827,46 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus substitusi pada cincin aromatis pada posisi *para*, sedangkan pada bilangan gelombang $\bullet = 3315,63 \text{ cm}^{-1}$ dan $1606,70 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya cincin aromatis =C-H dan -OH (Lampiran 4).

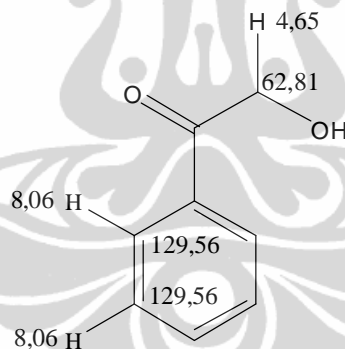
4.2.5.3 Spektrum Resonansi Magnetik Inti (NMR)

Untuk melengkapi data spektroskopi di atas, telah dilakukan pengukuran spektrum $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6). Nilai pergeseran kimia HNMR pada hasil pengukuran senyawa AFB adalah $\delta_{\text{H}} 4,65 \text{ ppm}$ (s, 1H) dan $\delta_{\text{H}} 8,06 \text{ ppm}$ (s, 2H). Pada nilai pergeseran kimia yang diperoleh menunjukkan adanya pasangan proton berupa proton yang terikat pada ikatan H-C-O- yang muncul pada daerah $\delta_{\text{H}} 4,65$

ppm dan suatu cincin aromatik yang muncul pada daerah δ_H 8,06 (Lampiran 5a), data spektroskopi spektrum ^{13}C -NMR (DMSO- D_6 , 125 MHz) diperoleh nilai geseran kimia 62,81 ppm, 129,56 ppm, 133,51 ppm dan 164,74 ppm (Lampiran 6a).

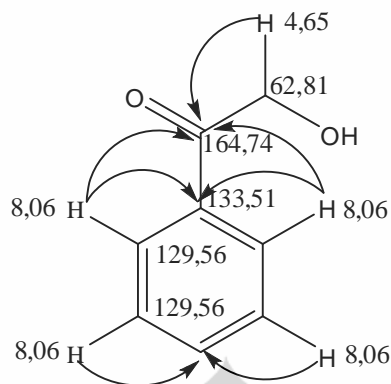
Data spektrum DEPT ^{13}C NMR pada senyawa AFB menunjukkan bahwa atom C pada $\bullet_C = 62,81$ ppm adalah metilen (CH_2), atom C pada $\bullet_C = 129,56$ ppm adalah metin (CH) pada cincin aromatis, atom C pada $\bullet_C = 133,51$ ppm dan 164,74 ppm adalah atom C kuarterner yang berikatan dengan gugus karbonil.

Hubungan antara atom karbon dan proton dapat ditentukan dengan melakukan analisis data spektroskopi HMQC dan HMBC. Data HMQC menunjukkan adanya ikatan antara proton pada daerah δ_H 4,65 ppm dengan atom C pada daerah \bullet_C 62,81 ppm sedangkan proton pada daerah δ_H 8,06 ppm berikatan dengan atom C pada daerah \bullet_C 129,56 ppm (Lampiran 7a). Dari data ini dapat diperoleh kemungkinan struktur pada senyawa adalah sebagai berikut :



Gambar 4.2 Hubungan antara atom karbon dan proton (MHQC) senyawa AFB

Data HMBC menunjukkan adanya hubungan antara proton dengan atom karbon tetangganya pada jarak 2 samapai 3 ikatan. Hubungan antara proton pada daerah δ_H 4,65 ppm adalah dengan atom karbon pada daerah \bullet_C 164,74 ppm sedangkan proton pada daerah δ_H 8,06 adalah dengan atom karbon pada daerah \bullet_C 164,74 ppm dan atom karbon pada daerah \bullet_C 133,51 ppm. Kemungkinan hubungan ini dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 4.3 Hubungan antara atom karbon dan proton (MHBC) senyawa AFB

Adanya pasangan signal proton aromatik sebagaimana yang digambarkan di atas dan berdasarkan data spektrum pergeseran kimia yang telah diperoleh besar kemungkinan senyawa AFB memiliki struktur yang simetris. Untuk mengetahui jumlah ikatan rangkap pada senyawa AFB yang memiliki berat molekul 194 dengan perkiraan rumus molekul $C_{10}H_{10}O_4$ dapat dihitung menggunakan rumus :

$$F = X - 0,5Y + 0,5 Z + 1 \quad (4.1)$$

F = Jumlah cincin atau ikatan rangkap

X = jumlah atom tetravalen

Y = Jumlah atom H, halogen atau atom monovalen

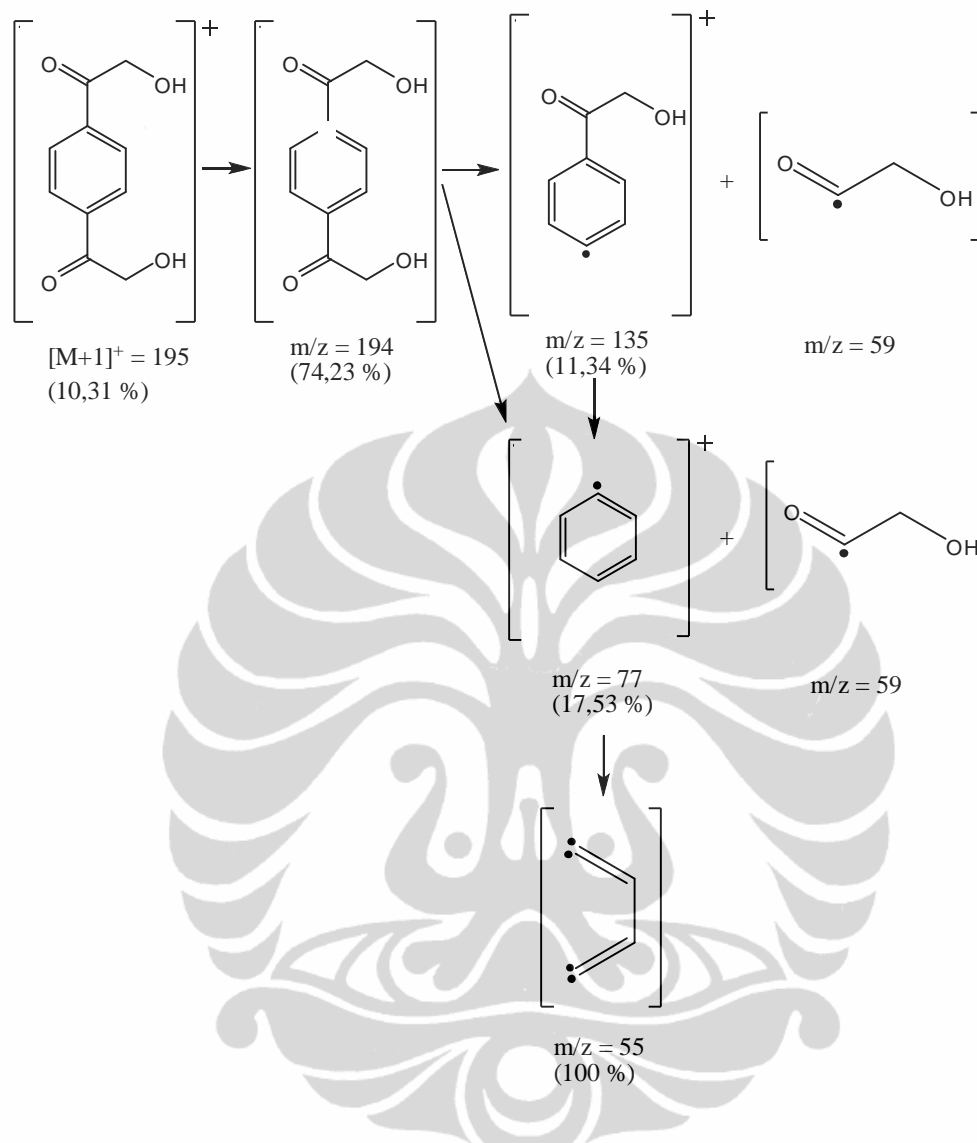
Z = Jumlah atom N, P atau atom trivalen

$$\begin{aligned} \text{maka } F &= 10 - (0,5 \times 10) + 1 \\ &= 10 - 5 + 1 = 6 \end{aligned}$$

Hasil ini menunjukkan bahwa jumlah ikatan rangkap pada senyawa AFB adalah 6. Jumlah ikatan rangkap ini berasal dari satu cincin aromatis yang memiliki 4 ikatan rangkap dan 2 gugus keton.

4.2.5.4 Spektrum Massa

Pola fragmentasi yang memungkinkan dimiliki oleh senyawa AFB sebagaimana yang terlihat pada spektrum GC-MS (Lampiran 11) dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 4.4 Pola fragmentasi spektrum massa pada senyawa AFB

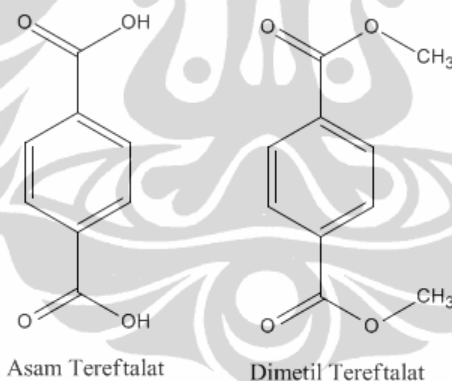
Berdasarkan pustaka dapat diketahui bahwa senyawa AFB yang diperoleh dari hasil penelitian ini memiliki kemiripan struktur dengan dimetil tereftalat yaitu suatu turunan dari asam tereftalat. Senyawa ini diperoleh dari hasil isolasi dari bunga tumbuhan *Cytisus scoparius* (HDS Software, 2005). Kemiripan kedua senyawa ini dapat dilihat dari nilai pergeseran kimia masing-masing senyawa seperti pada tabel 4.8.

Tabel 4.8 Perbandingan nilai pergeseran kimia senyawa AFB dan dimetil tereftalat

Atom C	Nilai Geseran Kimia (ppm)	
	Senyawa AFB	Dimetil Tereftalat*
1	133,51	134,4
2	129,56	129,8
1'	164,74	165,9
2'	62,81	51,5
Atom H		
2	8,06	7,83
2'	4,65	3,89

[*Sumber : Ramakrishna, *et al.*, 2005]

Perbedaan mendasar dari kedua senyawa ini terletak pada gugus hidroksi etanon yang terikat pada atom C1 pada senyawa AFB sedangkan pada dimetil tereftalat adanya gugus metoksi pada senyawa tereftalat, dari kemiripan ini ada kemungkinan senyawa AFB juga merupakan turunan dari asam tereftalat.

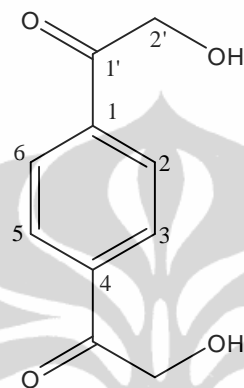


[Sumber: HDS Software, 2005]

Gambar 4.5 Struktur dimetil tereftalat dan asam tereftalat

Dari keseluruhan data yang telah dianalisis maka dapat diketahui struktur senyawa AFB memiliki inti aromatis tersubstitusi yang diperkuat oleh penyerapan panjang gelombang maksimum sinar UV 253 nm, spektrum IR pada bilangan gelombang pada $\nu = 827,46 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan ikatan C=C aromatis, spektrum $^1\text{H-NMR}$ pada $\delta 8,06 \text{ ppm}$ dan spektrum DEPT $^{13}\text{CNMR}$ yang ditunjukkan oleh atom C pada $\nu_{\text{C}} = 129,56 \text{ ppm}$. Data IR menunjukkan bahwa pada senyawa AFB terdapat adanya gugus karbonil C=O pada bilangan gelombang $\nu = 1722,43 \text{ cm}^{-1}$

yang diperkuat oleh spektrum DEPT ^{13}C NMR pada $\bullet_{\text{C}} = 164,74$ ppm. Berdasarkan penelusuran pustaka, ada kemungkinan senyawa AFB adalah senyawa baru. Secara keseluruhan senyawa AFB diperkirakan memiliki struktur sebagai berikut :



1,1'-(1,4-phenylene)bis(2-hydroxyethanone)

Gambar 4.6 Struktur senyawa AFB

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil isolasi dan penentuan struktur senyawa kimia berdasarkan data spektroskopi maka dapat disimpulkan :

1. Senyawa AFB (Acorus Fraksi Butanol) diperkirakan adalah senyawa 1,1'-(1,4-phenylene)bis(2-hydroxyethanone) dengan rumus molekul $C_{10}H_{10}O_4$.
2. Senyawa AFB (Acorus Fraksi Butanol) pada fraksi *n*-butanol dari rimpang *Acorus calamus* L. aktif menghambat aktivitas α -glukosidase dengan nilai IC_{50} 17,89 μ g/mL.

5.2 Saran

Untuk melengkapi data penelitian ini hendaknya dilakukan isolasi dan pengujian pada ekstrak yang lebih polar seperti pada ekstrak metanol, guna lebih melengkapi data yang telah ada, sehingga rimpang *Acorus calamus* L. lebih dimungkinkan untuk dikembangkan dalam pengobatan penyakit diabetes. Penggunaan metode *in silico* juga dapat dilakukan untuk membandingkan peningkatan aktivitas inhibisi antara senyawa AFB dengan turunan-turunannya.

DAFTAR REFERENSI

- Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1991). *Inventaris tanaman obat Indonesia*, Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Bains, J.S., et al. (2005). Novel lectins from rhizomes of two *Acorus* species with mitogenic activity and inhibitory potential towards murine cancer cell lines. *International Immunopharmacology*, 5, 1470–1478.
- Basuki, T., et al. (2002). *Evaluasi aktivitas daya hambat enzim α -glukosidase dari ekstrak kulit batang, daun, bunga dan buah kemuning [Murraya Paniculata (L.) Jack.]*. Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXI. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Surabaya.
- Bayer. (2004). *Precose (Acarbose Tablets)*.
<http://www.drug.com/PDR/PrecoseTablets.html>. 14/06/2004
- Begum, J., et al. (2004). In vitro antifungal activity of asaron isolated from rhizome extract of *Acorus calamus* L. *Pakistan Journal of Biological Science*, 7, 8, 1376-1379.
- Bösenberg, L.H. (2008). The mechanism of action of oral antidiabetic drugs: a review of recent literature. *The Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa*, 13, 3, 80-88.
- Carrier, R., Bordanaro, J., dan Yip, K. (1997). *Liquid chromatography*
<http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/BiotechEnviron>. 25/05/10
- Cesspooch, L. (2005). Native american traditional medicine and diabetes: *Acorus calamus* L.A Sacred Medicinal Plant of the Native Cree.
<http://hlunix.hl.state.ut.us/diabetes/telehealth/2005archives.htm>.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1978). *Materia Medika Indonesia* Volume II. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Department of Noncommunicable World of Health Organization. (1999). *Report of a WHO consultation part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus definition and its complications*. Geneva: WHO.
- Dewi, R.T., et al. (2007). Inhibitory effect of Koji *Aspergillus terreus* on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Pakistan Journal of Biological Science*, 18, 3131-3135.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. (1986). *Sediaan galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.


- Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian Dan Alat Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2005). *Pharmaceutical care untuk penyakit diabetes mellitus*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Ellenberg, M., dan Harold, R. (1983). *Diabetes mellitus: theory and practice* (3rd ed.). New York : Medical Examination Publishing Co. Inc.
- Farnsworth, N.R. (1983). *The napralet data base as an information source for application to traditional medicine*. Geneva : WHO.
- Ganiswara, S.G., et al. (1999). *Farmakologi dan terapi*. Edisi ke-4. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta: UI Press.
- Gilani, A.H., et al. (2006). Antispasmodic effect of *Acorus calamus* Linn. is mediated through calcium channel blockade. *Phytotherapy Research*, 20, 1080-1084.
- Gholamhoseinian, A., et al. (2008). Inhibitory effect of some iranian plans extracts on the α -glucosidase. *Iranian Journal of Basic Medical Science*, 11, 1, 1-9.
- Goldsmith, E.J., Fletterick, R.J., dan Withers, S.G. (1987). The three-dimensional structure of Acarbose Bound to Glycogen Phosphorylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 4, 1449-1455.
- Hao, S.W., et al. (2007). A Fraction of *Acorus calamus* L. extract devoid of α -asarone enhances adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Phytotherapy Research*, 21, 562-568.
- Hao, S.W., et al. (2009). Insulin sensitizing activity of ethyl acetate fraction of *Acorus calamus* L. in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 123, 288-292.
- Harborne, J.B. (1987). *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Mengekstraksi Tumbuhan*. Terjemahan Padmawinata. K. Bandung: Penerbit ITB.
- Hargreaves, S. (2010). *Types of Chromatography*.
<http://www.buzzle.com/articles/types-of-chromatography.html>. 25/05/10
- HDS Software. (2006). *Dictionary of natural product* (CD-ROM Ver. 14:2). Chapman & Hall. Florida: Hapdem Data Service Ltd.
- Hongxiang H., Tang, G., dan Liang, V.W. (2009). *Hypoglycemic herbs and their action mechanisms*. Chinese Medicine. <http://www.cmjournal.org/content/4/1/10>

- Hyeri, K., Tae, H.H., dan Seong, G.L. (2009). Anti-inflammatory activity of a water extract of *Acorus calamus* L. leaves on keratinocyte HaCaT cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 149–156.
- Integrated Taxonomic Information System. November 14, 2010.
<http://www.itis.gov/>
- Jarald, E., Joshi, S.B., dan Jain, D.C. (2008). Diabetes and herbal medicines. *Iranian Journal Of Pharmacology & Therapeutics*, 7, 1, 97-106.
- Jenney. (2007). *Penentuan marker ekstrak rimpang dringo (Acorus calamus l.) sebagai bahan baku untuk sediaan antidiabetes*. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.
- Kim, Y.M., et al. (2005). Inhibitory effect of Pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition*, 21, 756-761.
- King, F.D. (1994). *Medical Chemistry : Principles and Practice*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Koolman, J., Roehm, K.J. (2005). *Color Atlas of Biochemistry* (2nd ed.). New York: Thieme.
- Li, et al. (2005). *Punica granatum* flower extract, a potent α -glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *Journal Ethnopharmacology*, 99, 239-244.
- Manikandan, S., et al. (2005). Protective effect of *Acorus calamus* LINN on Free radical scavengers and lipid peroxidation in discrete regions of brain against noise stress exposed rat. *Biology Pharmacy Bulletin*, 28, 2327-2330.
- Mazza, G. (1985). Gas chromatographic and mass spectrometric studies of the constituents of the rhizome of calamus. I. The volatile constituents of the essential oil. *Journal of Chromatography*, 328, 179–194.
- Mehrotra, S., et al. (2003). Anticellular and immunosuppressive properties of ethanolic extract of *Acorus calamus* rhizome. *International Immunopharmacology*, 3, 53–61.
- Mei, S., et al. (2010). Insulin releasing and alpha-glucosidase inhibitory activity of ethyl acetate fraction of *Acorus calamus* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*, 12, 154-159.
- Mungkornasawakul, P. (2000). *Fungicide from Acorus calamus Linn., Eugenia caryophyllus Bullock et Harrison & Mammea siamensis Kosterm. and their residues after application*. Chiang Mai: Chiang Mai University.

- Nalamwar, V.P., et al. (2009). *In vitro* lincidal activity of different extracts of *Acorus calamus* Linn. (Araceae) Rhizome. *International Journal of Pharm Tech Research*, 1, 96-100.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry* (3rd ed.). University of Wisconsin. Wisconsin: Worth Publishers.
- Ophardt, C.E. (2004). *Mechanism of drug action by enzyme inhibition*. <http://www.elmhurst.edu/~chm/chembook/651enzymeinhibit.html> (18/06/2004)
- Palani, S., et al. (2009). Therapeutic efficacy of antihepatotoxic and antioxidant activities of *Acorus calamus* on acetaminophen-induced toxicity in rat. *International Journal of Integrative Biology*, 71, 39-44.
- Pandy, V., Jose, N., dan Subhash, H. (2009). CNS activity of methanol and acetone extracts of *Acorus calamus* leaves in mice. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4, 2, 79-86.
- Parab, R.S., Mengi, S.A. (2002). Hypolipidemic activity of *Acorus calamus* L. in rats. *Fitoterapia*, 73, 451-455.
- Patra, A., Mitra, A.K. (1979). Constituents of *Acorus calamus* Linn. *Indian Journal Chemistry*, 17B, 412-414.
- Phongpaichit, S. et al. (2005). Antimicrobial activities of the crude methanol extract of *Acorus calamus* Linn. *Songklanakarin Journal Science Technology*, 27, 517-523.
- Ramakrishna, S. et al. (2005). *An Introduction to electrospinning and nanofibers*, Singapore : World Scientific Publishing.
- Rydberg, J., Cox, M. (2004). *Solvent extraction principles and practice* (2nd ed.). New York: M. Dekker.
- Sarker, D., Latif, Z., Gray, A.I. (2006). *Natural products isolation* (2nd ed.). New Jersey: Humana Press.
- Silva, M.L. (2004) *Diabetes means siphon insulin comes from the island*. http://www.apol.net/dightonrock/diabetes_history.html. 10/05/2004
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., & Kiemble, D.J. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds* (7th ed.). USA: John Wiley and Sons.
- Slagle, M. (2002). Alpha-glucosidase inhibitor. *Southern Medical Journal*. <http://static.highbean.com/s/southernmedicaljournal/01/01/2009>.

- Sugiwati, S., Setiasi, S., Afifah, E. (2009). Antihyperglycemic activity of the mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (scheff.) boerl.] leaf extracts as an alpha-glucosidase inhibitor. *Makara, Kesehatan*, 13, 2, 74-78.
- Tippiani, R. et al. (2008). *Analgesic activity of root extract of Acorus Calamus* Linn. *Pharmacology on line*, 3, 240-243.
- Thirach, S. et al., (2003). Antifungal activity of some medicinal plant extracts against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Acta Horticulturae*, 597, 217-221.
- Tissue, B.M. (2000). *Liquid Chromatography (LC)*. <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/sep/lc/lc.html>. 25/05/2010.
- Tjokroprawiro, A., Hendromartono., & Ari, S. (1988). Aspek klinik diabetes mellitus di bidang kedokteran gigi. *Majalah Ilmu Penyakit Dalam*, 14, 1, 15-36.
- Utami, P., Tim Lentera. (2003). *Tanaman obat untuk mengatasi diabetes mellitus*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Yende, S.R., et al. (2008). Pharmacological profile of *Acorus calamus*: an overview. *Pharmacognosy Reviews*, 2, 22-26.
- Zaini, N.C. (1993). *Upaya mutakhir dan tantangan pengembangan obat dari tumbuhan indonesia*. Pidato Pengukuhan Guru Besar Dalam Ilmu Fitokimia Pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

Lampiran 1. Hasil identifikasi tanaman



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, 21 Juni 2010

Nomor : *01* /IPH.1.02/If.8/VI/2010
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan


Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). Ahmad Najib
NPM : 0806477030
Mhs. Univ. Indonesia
Fak. MIPA
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	Dringo	<i>Acorus calamus</i> L.	Acoraceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

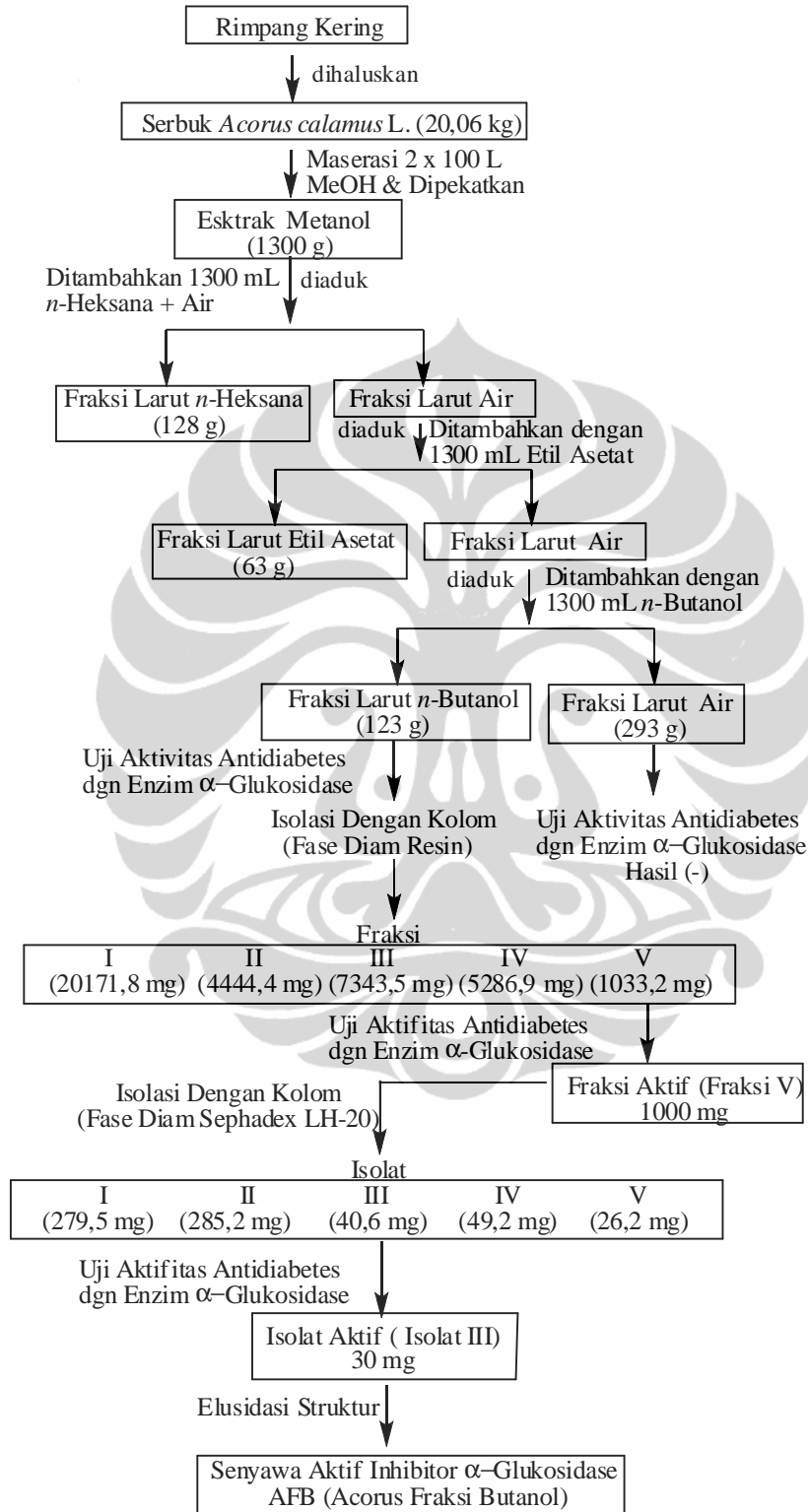


Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,
Prof. Dr. Eko Baroto Walujo
NIP. 195111041975011001

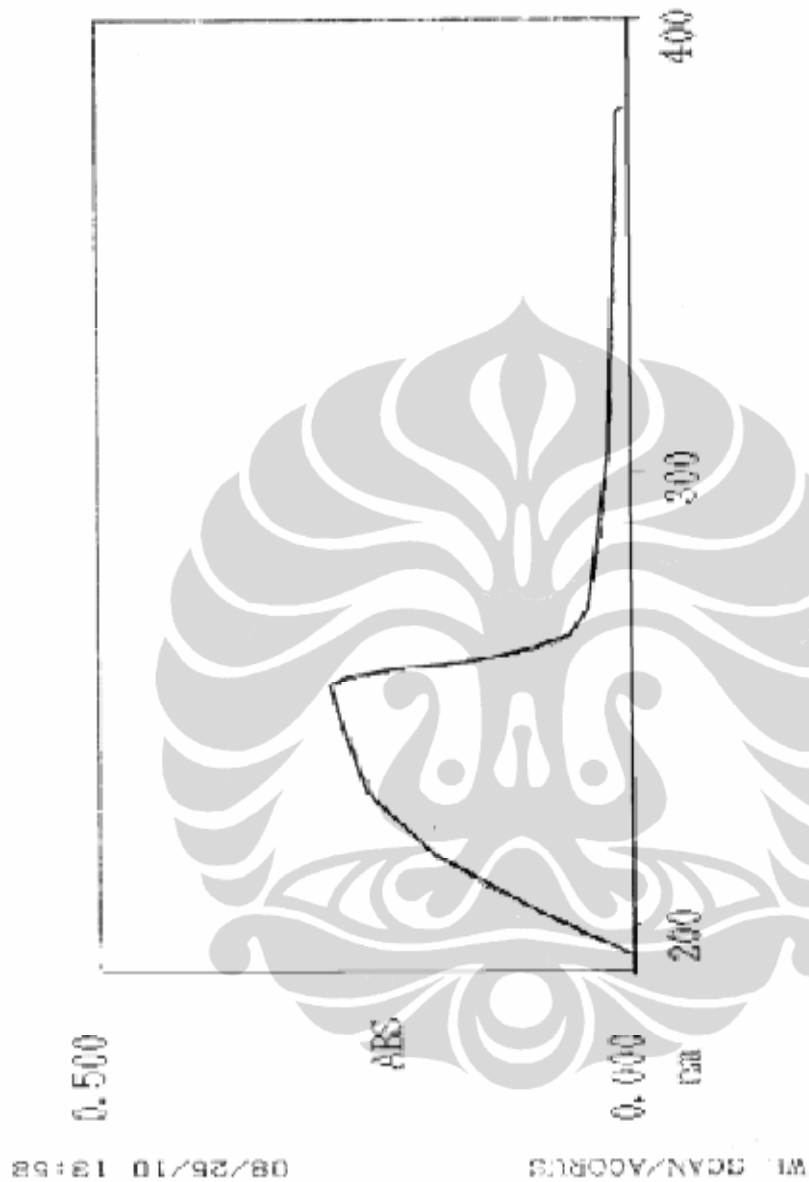
D:\Ident 2010\Ahmad Najib.doc\JJA-SP

Page 1 of 1

Lampiran 2. Skema kerja



Lampiran 3. Spektrum UV-Vis senyawa AFB



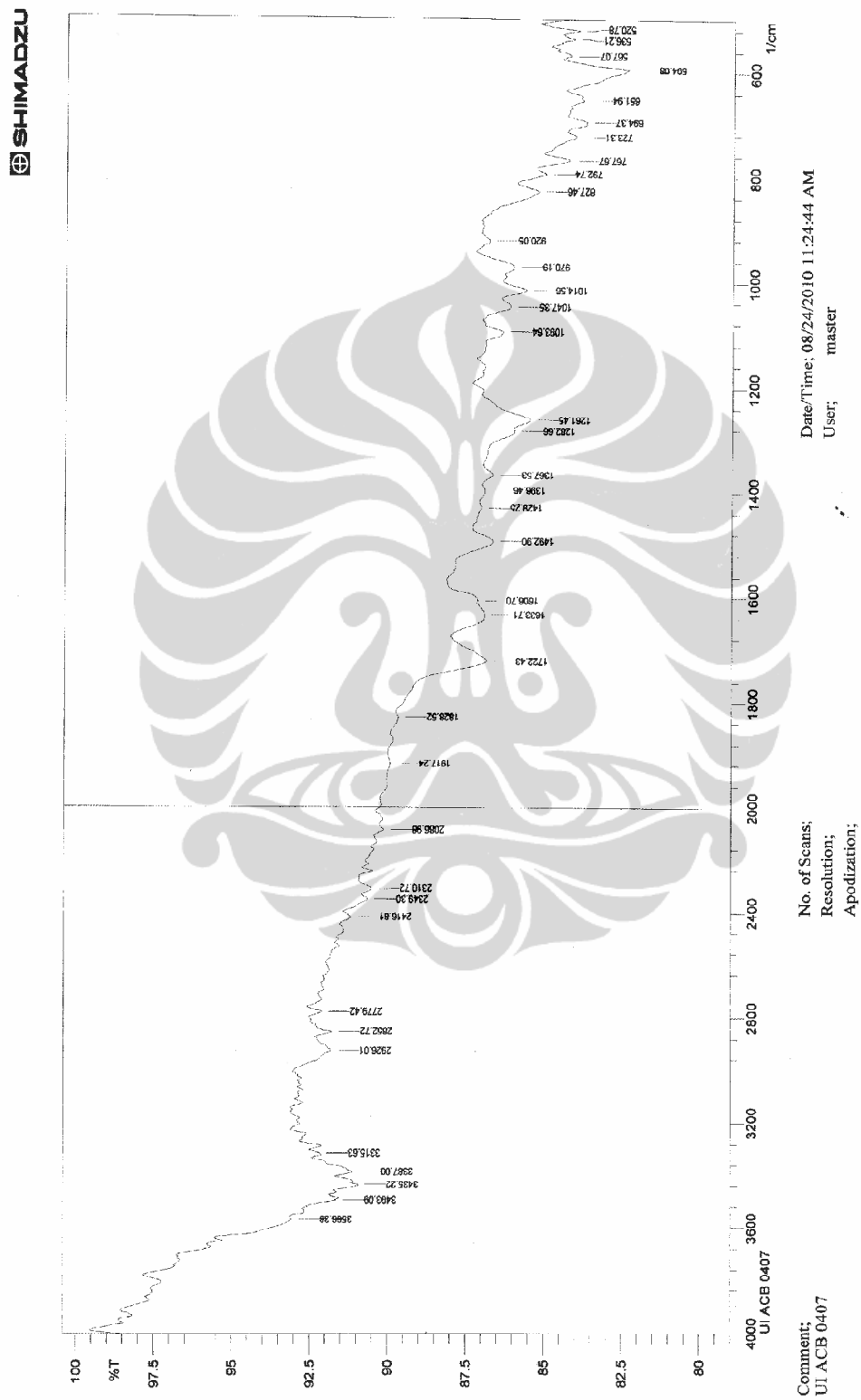
WL SCAN/ACCRUS

08/25/10 13:58

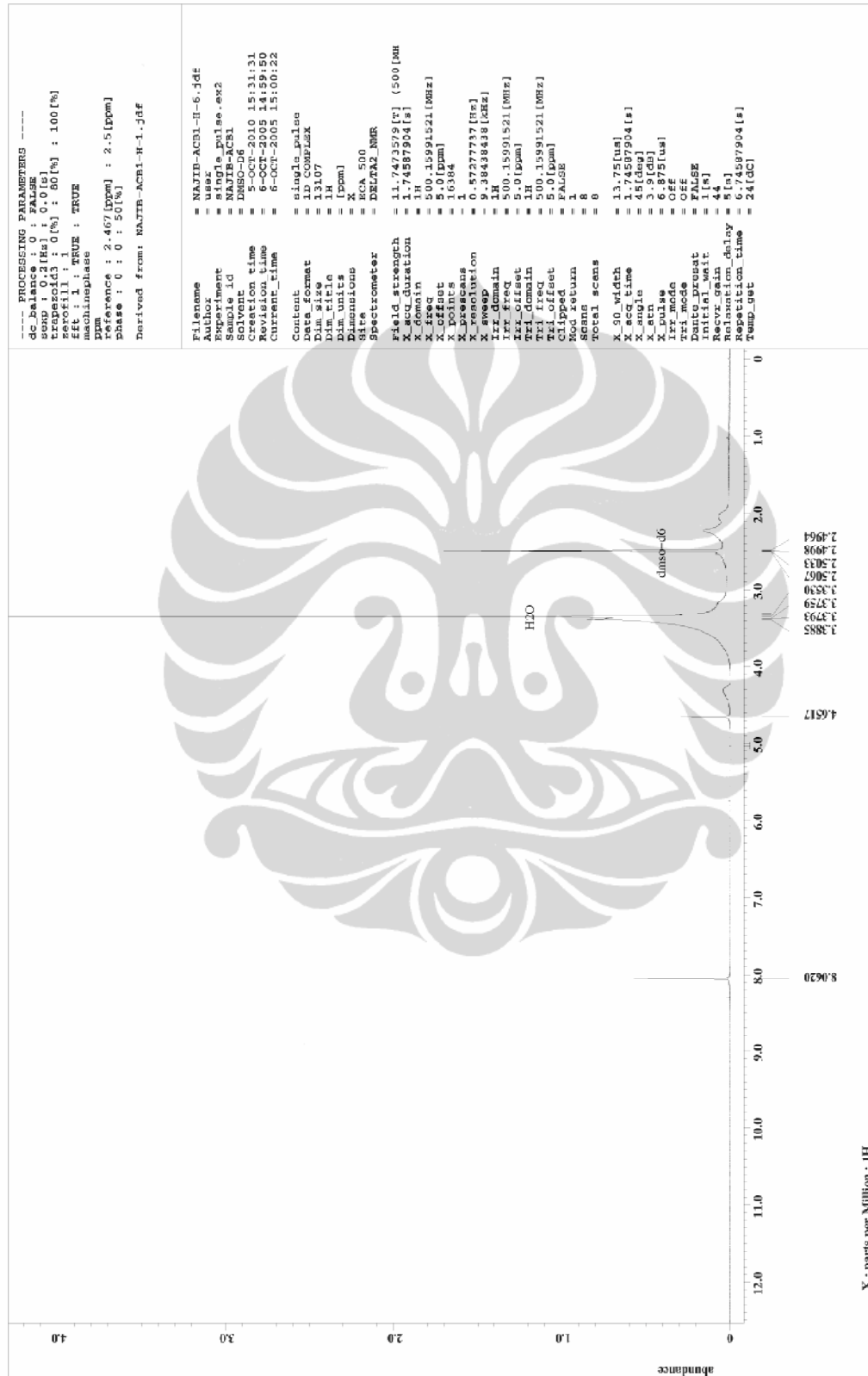
PEAK		
NO.	nm	ABS
1	341.5	0.015
2	252.5	0.282

VALLEY	
nm	ABS
340.0	0.012

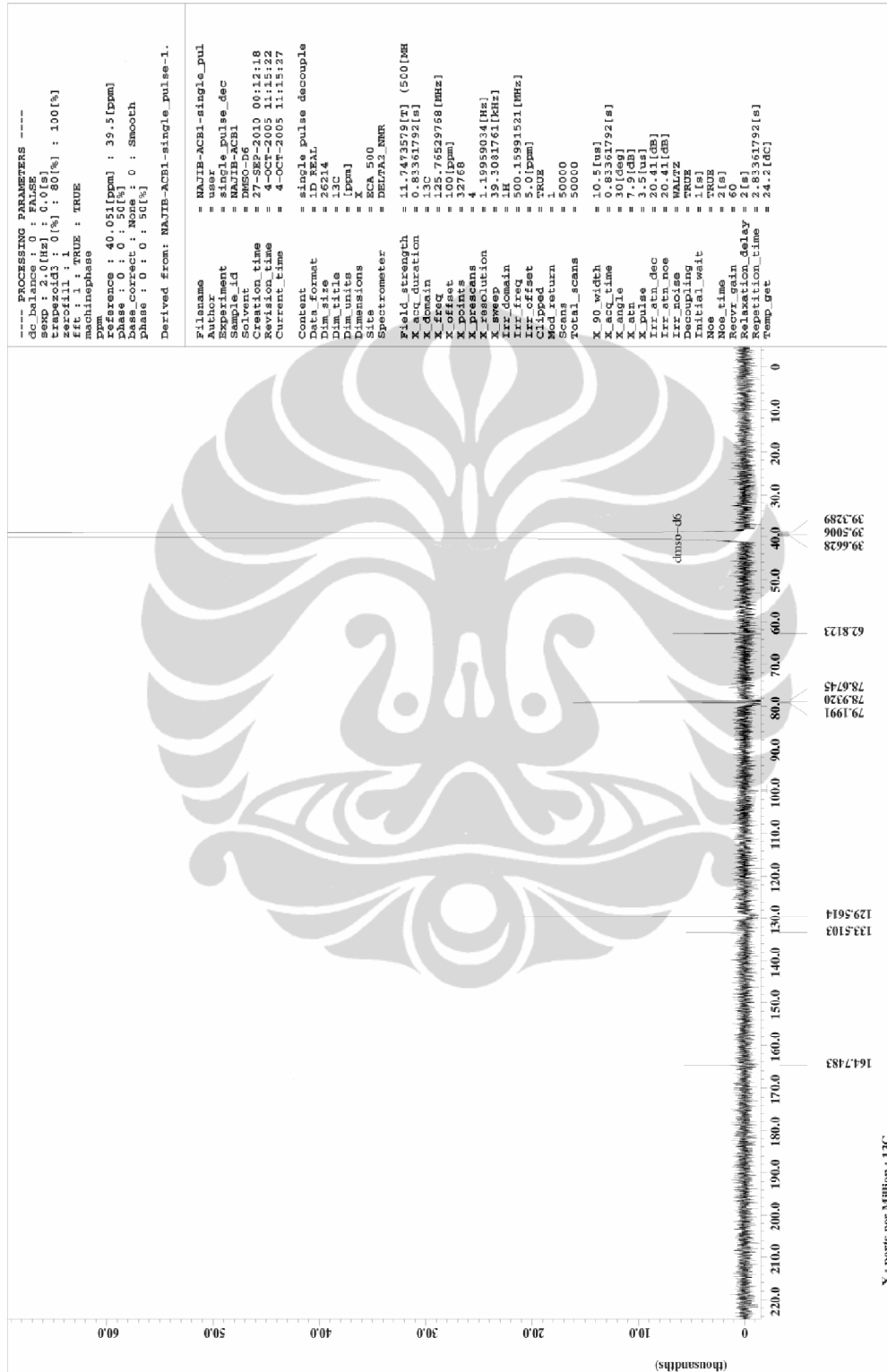
Lampiran 4. Spektrum infra merah (IR) senyawa AFB



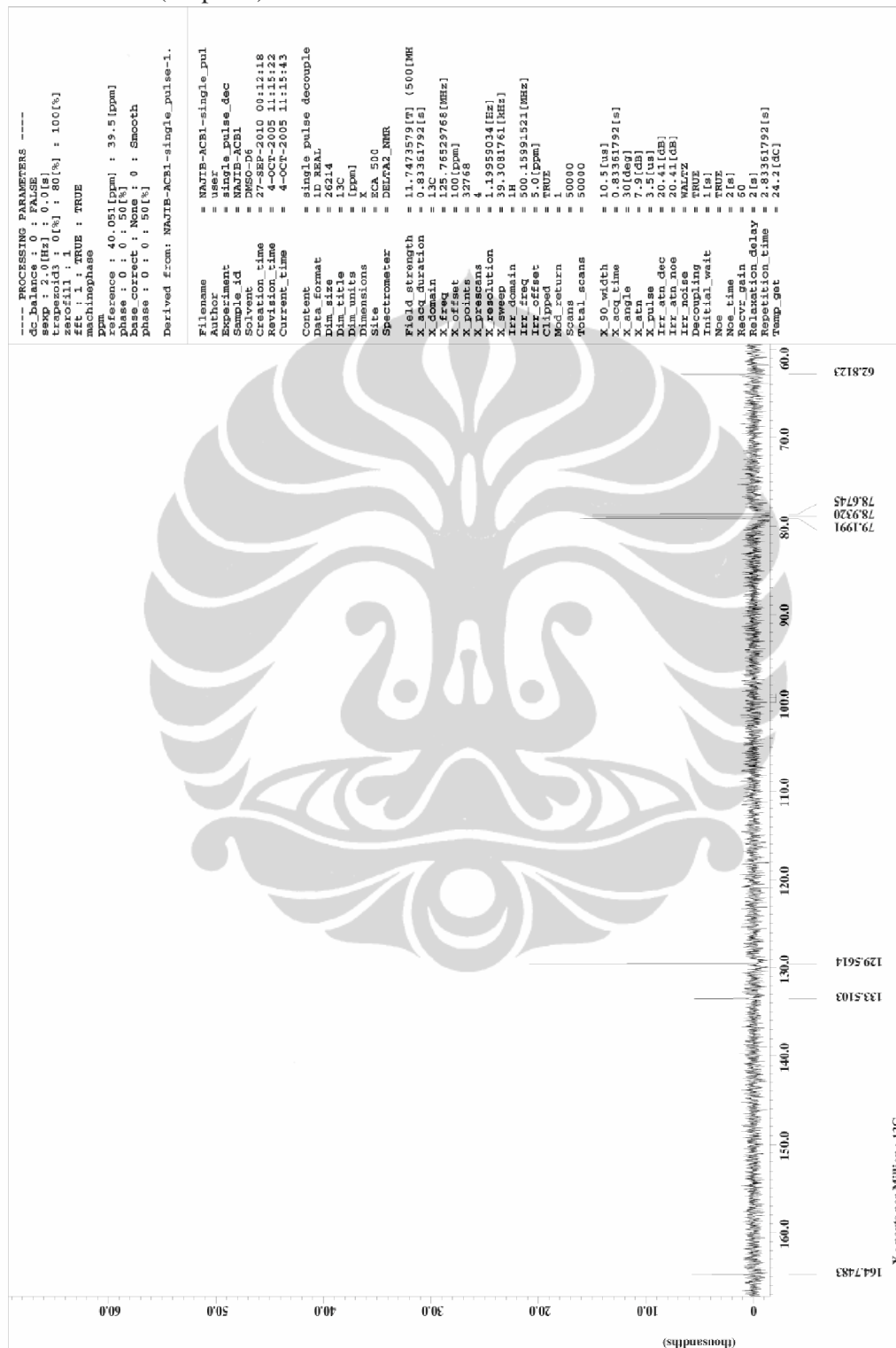
Lampiran 5a. Spektrum resonansi magnetik inti proton senyawa AFB



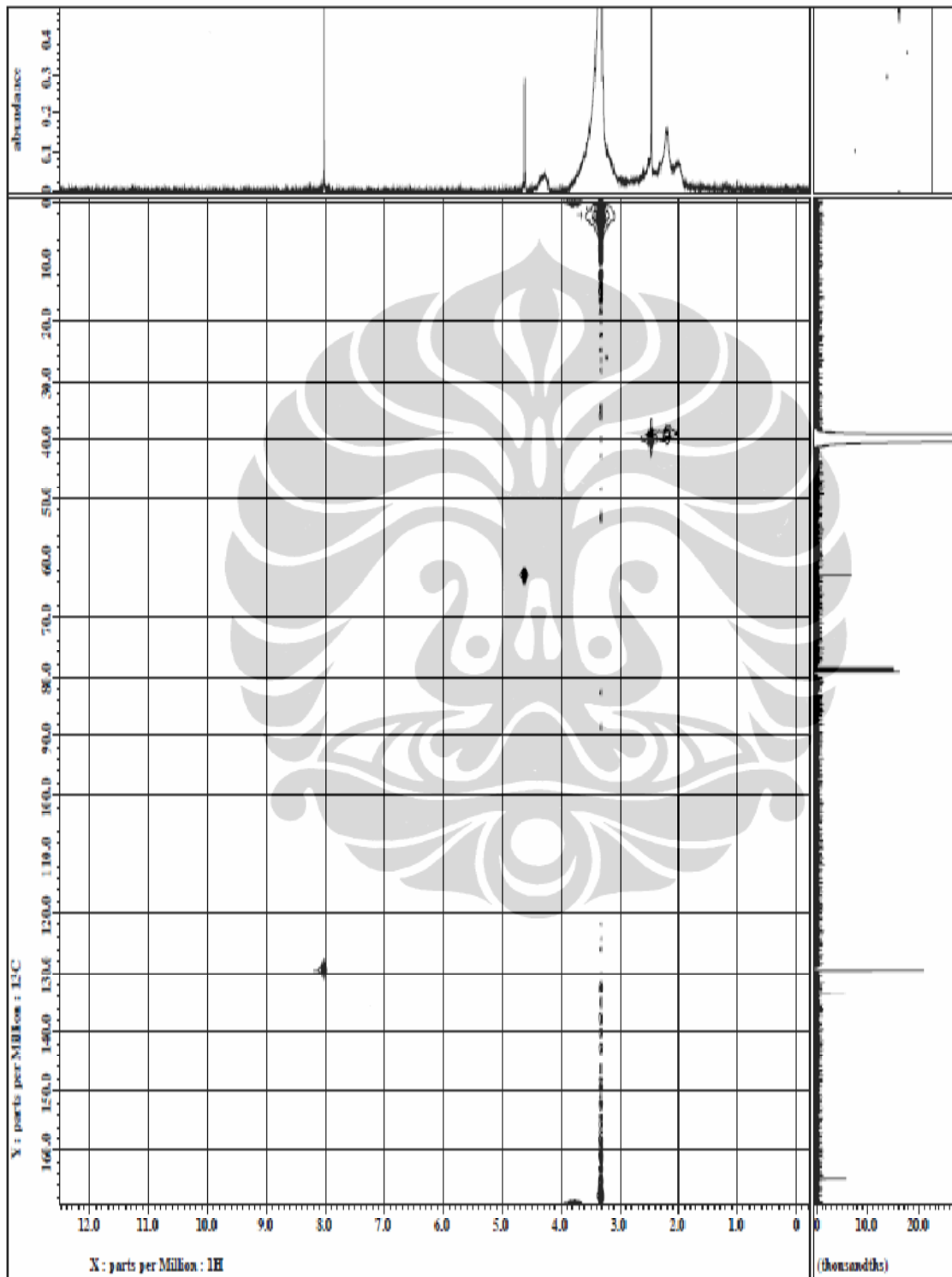
Lampiran 6a. Spektrum resonansi magnetik inti karbon senyawa AFB



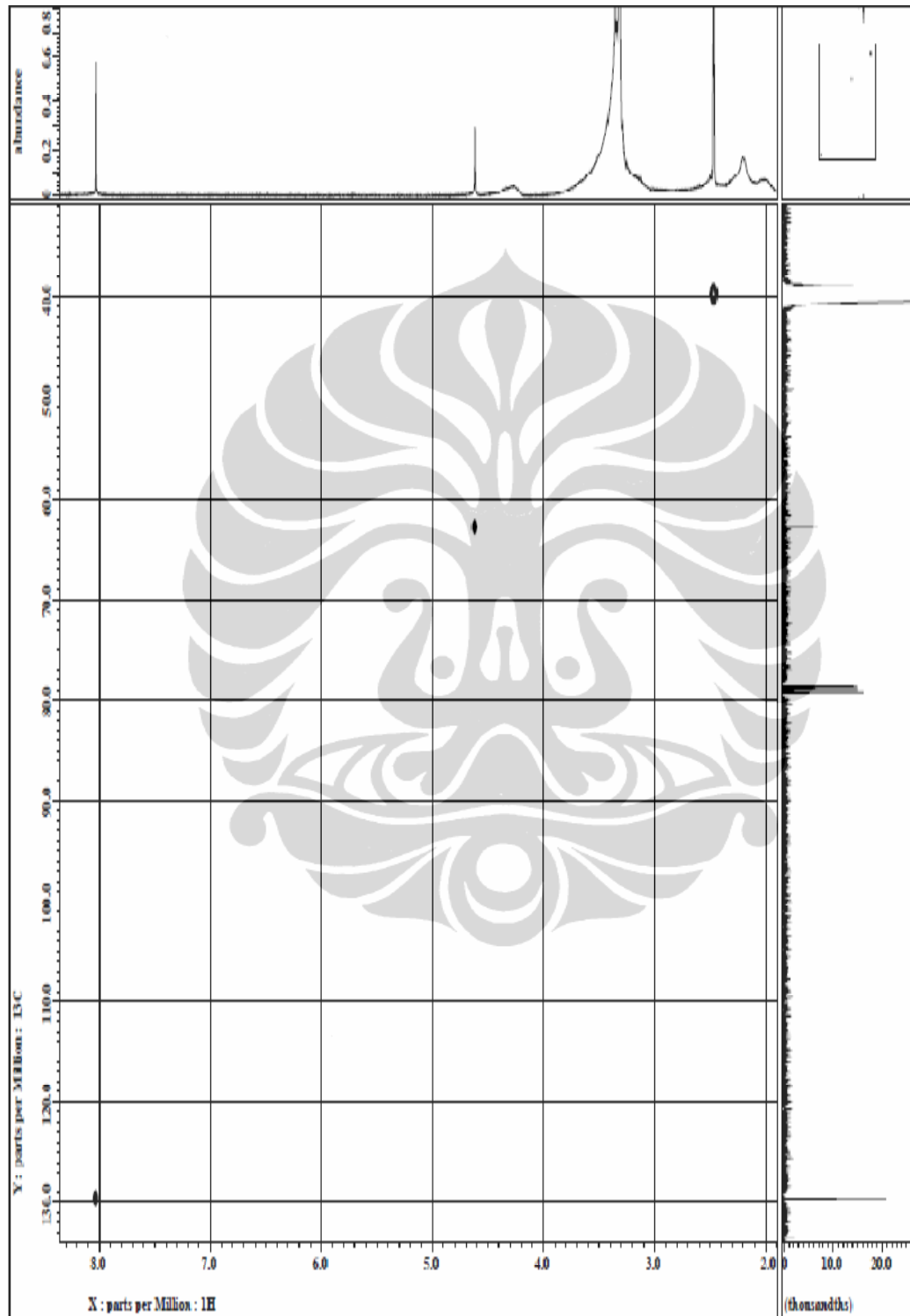
Lampiran 6b. Spektrum resonansi magnetik inti karbon senyawa AFB
(eskpansi)



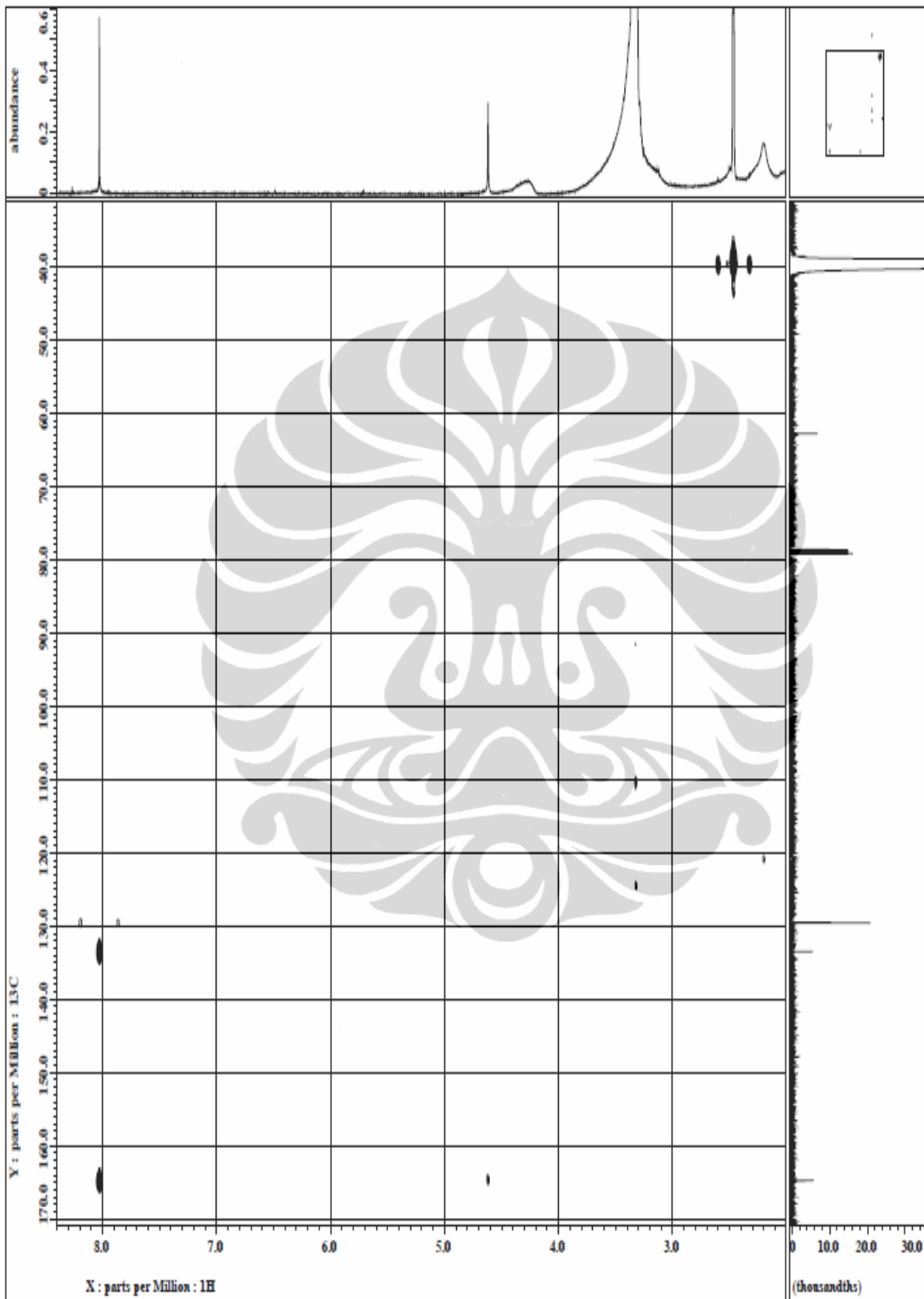
Lampiran 7a. Spektrum HMQC senyawa AFB



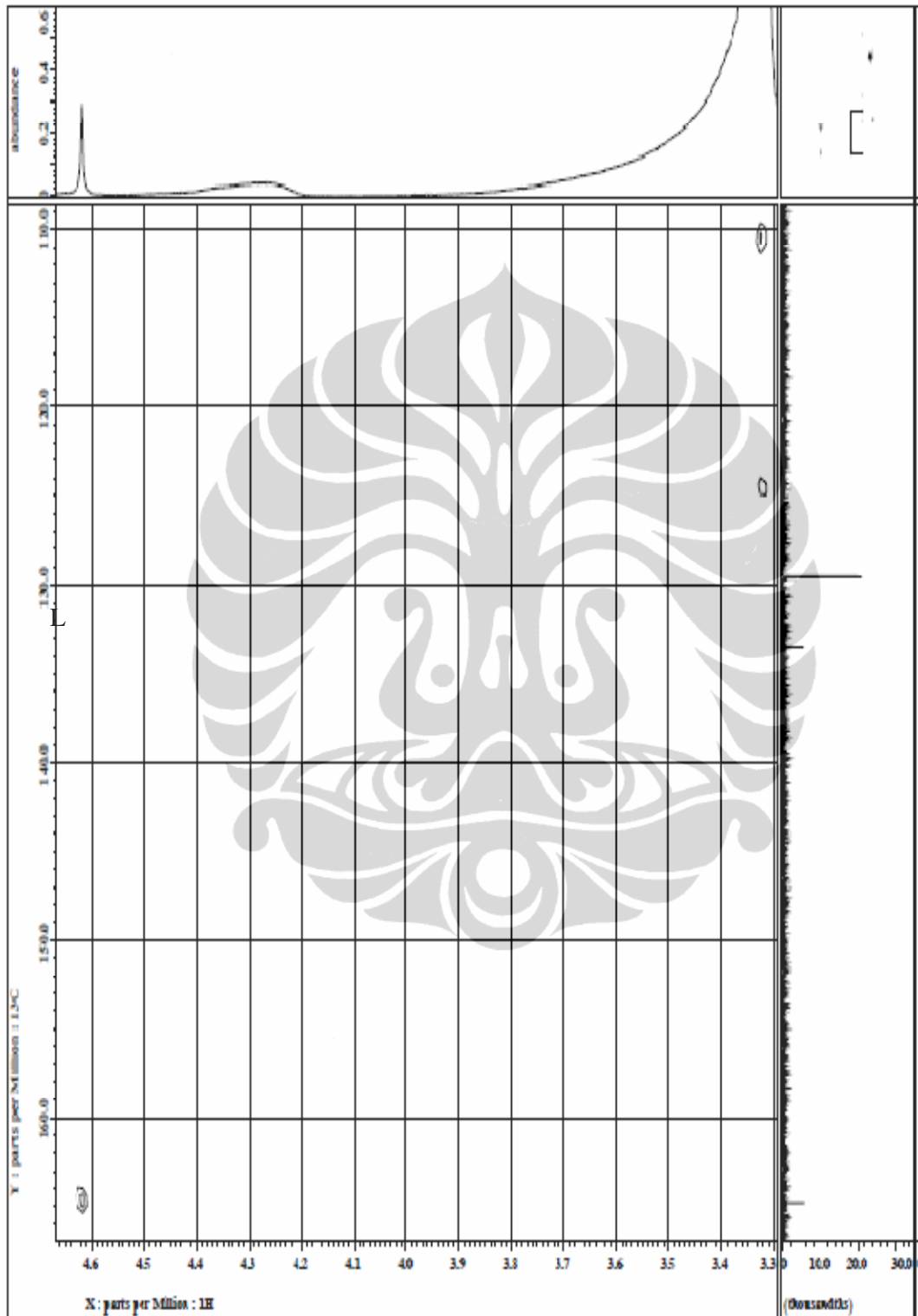
Lampiran 7b. Spektrum HMQC senyawa AFB (ekspansi)



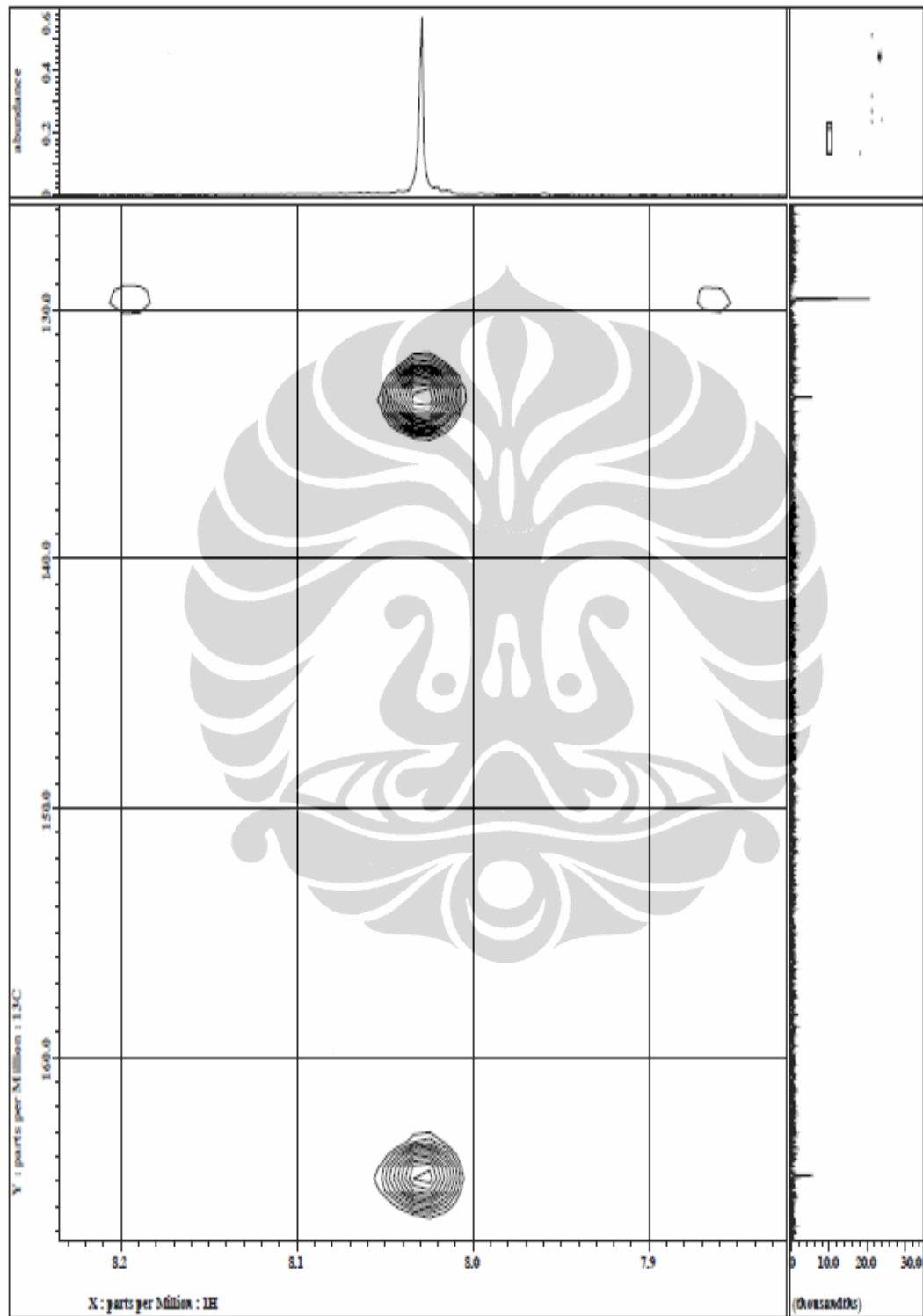
Lampiran 8a. Spektrum HMBC senyawa AFB

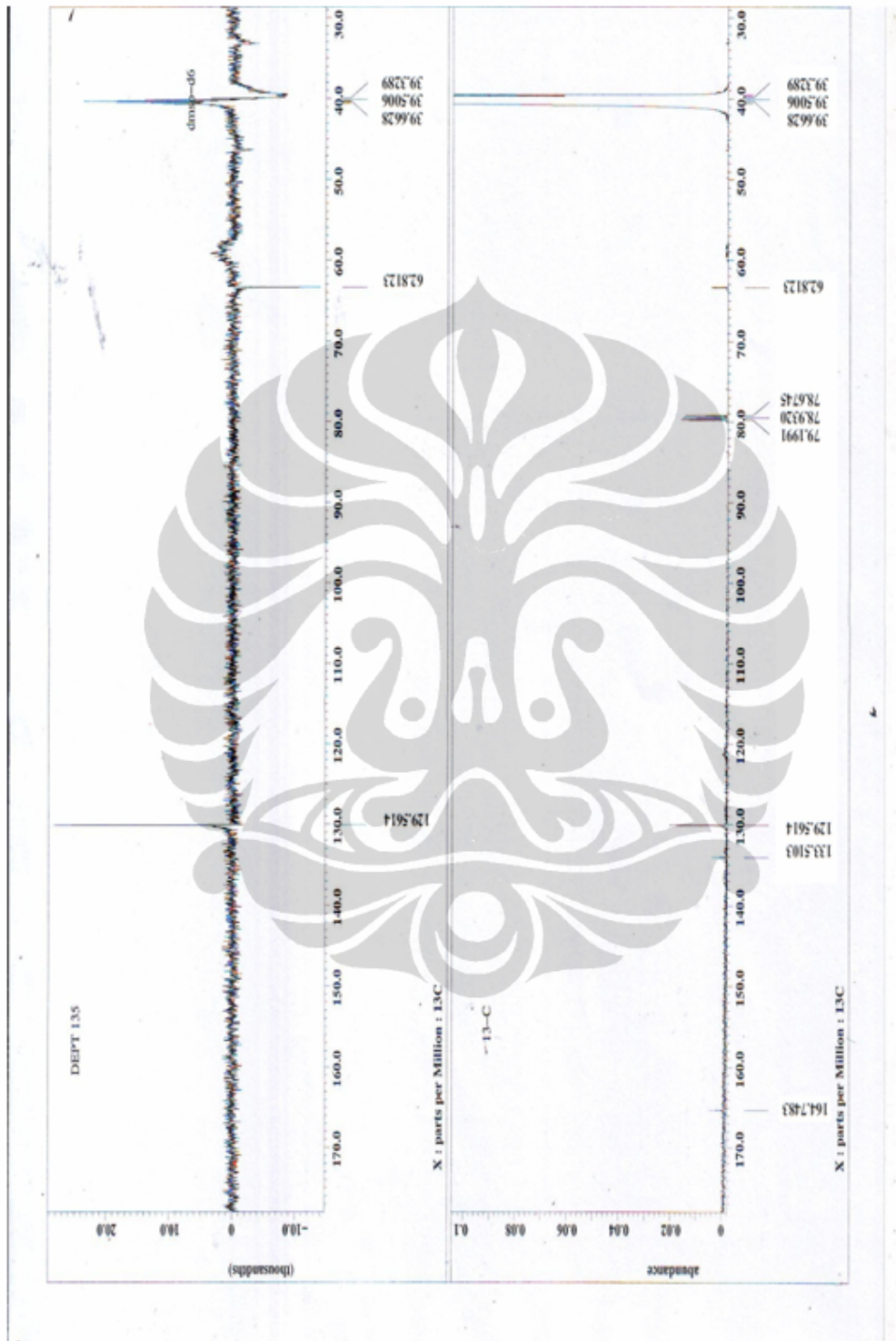


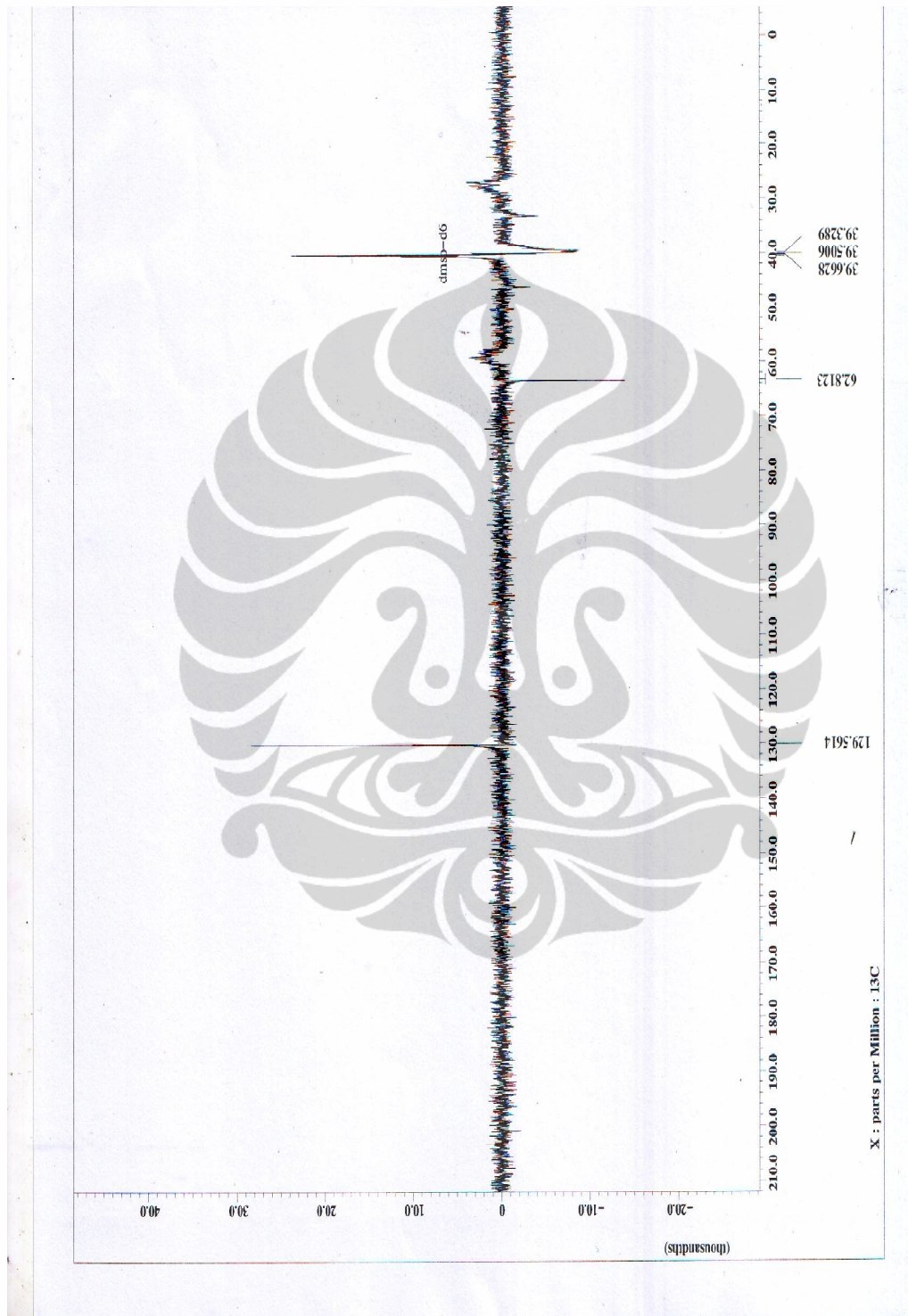
Lampiran 8b. Spektrum HMBC senyawa AFB (ekspansi)

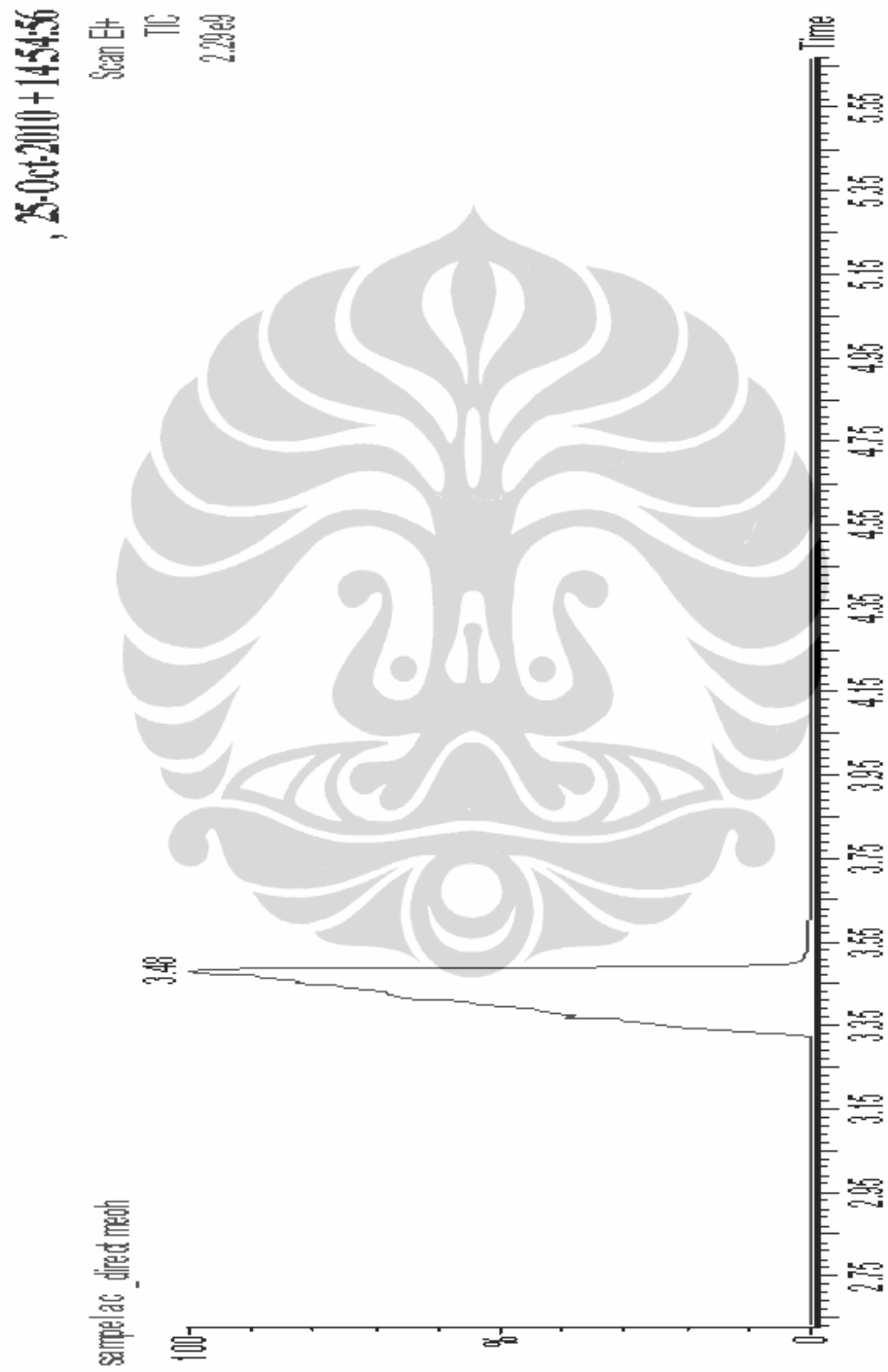


Lampiran 8c. Spektrum HMBC senyawa AFB (ekspansi)



Lampiran 9a. Spektrum DEPT ^{13}C NMR senyawa AFB

Lampiran 9b. Spektrum DEPT ^{13}C NMR senyawa AFB (ekspansi)

Lampiran 10. Kromatogram *Gas Chromatography* (GC) senyawa AFB

Lampiran 11. Spektrum EI-MS senyawa AFB

