



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIDIABETES FRAKSI-FRAKSI BUAH  
KETAPANG (*Terminalia catappa* L.) DENGAN METODE  
PENGHAMBATAN AKTIVITAS  $\alpha$ -GLUKOSIDASE DAN  
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI  
FRAKSI YANG AKTIF**

**SKRIPSI**

**DEVI SOFAWATI  
0806453535**

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



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIDIABETES FRAKSI-FRAKSI BUAH  
KETAPANG (*Terminalia catappa* L.) DENGAN METODE  
PENGHAMBATAN AKTIVITAS  $\alpha$ -GLUKOSIDASE DAN  
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI  
FRAKSI YANG AKTIF**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Farmasi**

**DEVI SOFAWATI  
0806453535**

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

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Devi Sofawati

NPM : 0806453535

Tanda Tangan : 

Tanggal : Januari 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Devi Sofawati  
NPM : 0806453535  
Program Studi : Sarjana Farmasi  
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Antidiabetes Fraksi-fraksi Buah Ketapang (*Terminalia cattapa* L.) dengan Metode Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi yang Aktif.

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

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt

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

Penguji 1 : Dra. Azizahwati, M.S., Apt

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

Penguji III : Dr. Arry Yanuar M.Si., Apt

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : Januari 2012



## KATA PENGANTAR

Tiada kata yang pantas diucapkan selain *alhamdulillahirabbil'alamin* kepada Allah *Subhana wa Ta'ala*, yang atas izin-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Penulisan skripsi ini tidaklah mudah. Banyak sekali orang-orang di sekitar yang telah membantu, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini diselesaikan. Untuk itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- 1) Bapak Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt selaku dosen pembimbing akademik dan dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi;
- 2) Ibu Dr. Katrin, M.S., Apt selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini;
- 3) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
- 4) Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Departemen;
- 5) Kedua orang tua, Bapa H. Djunaedi dan Mama Hj. Eneng Susliah yang tak pernah henti mendoakan demi kelancaran dan kesuksesan skripsi yang telah dijalani;
- 6) Kakak-kakak yang telah memberi masukan dan semangat, teteh, ka ipa, a dian, a dani, teh nuning, keponakan, dan seluruh keluarga;
- 7) Teman terdekat, Ahmadian Hafiz dan keluarga yang telah setia menemani, memberikan dukungan dan perhatian tiada henti.

- 8) Sahabat seperjuangan, Silvi, Ka Riza dan Ka Ayuti yang telah menemani dan berbagi suka, duka, canda, tawa, dan air mata selama penelitian ini;
- 9) Teman-teman, Kun, Ary, Siti, Dewi, Mayang dan Lisa yang telah berbagi selama masa perkuliahan dan penelitian.
- 10) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis sadar tak mampu memberikan sesuatu yang lebih berharga selain ucapan terima kasih dan berdoa semoga Allah membalas segala kebaikan mereka dengan sesuatu yang lebih baik lagi. Besar harapan terbentang semoga penulisan skripsi ini dapat berguna bagi ilmu pengetahuan khususnya bagi pengembangan ilmu kefarmasian sehingga manfaatnya dapat dirasakan oleh seluruh lapisan masyarakat.

Penulis

Januari 2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI**  
**KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

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

Nama : Devi Sofawati  
NPM : 0806453535  
Program Studi : Sarjana  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

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

Uji Aktivitas Antidiabetes Fraksi-fraksi Buah Ketapang (*Terminalia cattapa* L.) dengan Metode Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi yang Aktif

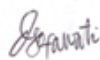
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : Januari 2012

Yang menyatakan



( Devi Sofawati )





## ABSTRAK

Nama : Devi Sofawati  
Program Studi : S1 Farmasi  
Judul : Uji Aktivitas Antidiabetes Fraksi-fraksi Buah Ketapang (*Terminalia catappa* L.) dengan Metode Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi yang Aktif

Diabetes mellitus (DM) adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia dan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein. Salah satu terapi farmakologi yang digunakan dalam mengobati DM adalah agen penghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang dapat menghambat penguraian disakarida sehingga menunda absorpsi glukosa dan menurunkan kadar glukosa *postprandial*. Penelitian terdahulu membuktikan bahwa ekstrak etanol 80% buah ketapang (*Terminalia catappa* L.) memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tertinggi bila dibandingkan dengan 15 tanaman lain yang diuji. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh fraksi dari ekstrak buah ketapang yang memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tertinggi dan mengetahui golongan senyawa kimia dari fraksi yang aktif. Serbuk simplisia buah ketapang dimaserasi menggunakan etanol 80%, kemudian difraksinasi menggunakan petroleum eter, etil asetat, butanol dan metanol. Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase menggunakan metode *Spectrophotometric Stop Rate Determination*. Absorbansi p-nitrofenol yang dilepaskan dari p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida sebagai substrat diukur pada panjang gelombang 400 nm. Hasil menunjukkan bahwa fraksi etil asetat buah ketapang memiliki penghambatan paling kuat terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan nilai  $IC_{50}$  2,94 ppm. Uji kinetika enzim menunjukkan bahwa fraksi etil asetat buah ketapang mempunyai penghambatan aktivitas kompetitif. Golongan senyawa kimia yang terdapat pada fraksi etil asetat buah ketapang adalah terpen, flavonoid dan glikosida.

Kata Kunci : diabetes melitus, penghambat  $\alpha$ -glukosidase, *Terminalia catappa* L., buah Ketapang.

xiv + 100 halaman ; 23 gambar; 27 tabel; 7 lampiran

Daftar Acuan : 74 (1966-2011)

## ABSTRACT

Name : Devi Sofawati  
Program study : S1 Pharmacy  
Title : Antidiabetic Activity Test from Fractions of Ketapang (*Terminalia catappa* L.) Fruits by Inhibition of  $\alpha$ -Glucosidase Activity Method and Phytochemical Identification from the Active Fraction.

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic disorders characterized by hyperglycemia and associated with abnormalities in carbohydrate, fat, and protein metabolism. One of pharmacologic therapies used in treating DM is  $\alpha$ -glucosidase activity inhibitor which can block the breaking down of disaccharides, delay the glucose absorption and reduce postprandial glucose levels. The previous study gave the evidence that 80% ethanol extract of Ketapang (*Terminalia catappa* L.) fruits have the highest  $\alpha$ -glucosidase activity inhibitor than 15 other plants. The purpose of this research was to get the fraction from Ketapang fruits extract which had the highest  $\alpha$ -glucosidase activity inhibitor and to know the phytochemical compounds from the active fraction. The powder of simplisia was maserated used 80 % ethanol. and was fractionated used petroleum ether, ethyl acetate, buthanol and methanol.  $\alpha$ -Glucosidase activity inhibitor test was performed by Spectrophotometric Stop Rate Determination method. The absorbance of p-nitrophenol released from p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranoside as substrat was measured at 400 nm. The result showed that ethyl acetate fraction of Ketapang fruits have the highest  $\alpha$ -glucosidase activity inhibitor with IC<sub>50</sub> values 2.94 ppm. The result of enzyme kinetics showed that ethyl acetate fraction of Ketapang fruits has a competitive activity inhibitor. Phytochemical identification showed that ethyl acetate fraction of Ketapang fruits contained terpenoids, flavonoids and glycosides.

Key Words : diabetes mellitus,  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, *Terminalia catappa* L., Ketapang fruits.  
xiv + 100 pages ; 23 pictures; 27 tables; 7 appendices  
Bibliography : 74 (1966-2011)



## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vii
ABSTRAK .....	viii
ABSTRACT .....	ix
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Diabetes Melitus .....	4
2.1.1 Definisi & Klasifikasi Diabetes Melitus.....	4
2.1.2 Terapi Diabetes Melitus.....	5
2.1.2.1 .....	
Target Terapi.....	5
2.1.2.2 .....	
Terapi Nonfarmakologi .....	6
2.1.2.3 Terapi Farmakologi.....	8
2.2 <i>Terminalia catappa</i> L. (Tanaman Ketapang) .....	15
2.3 Simplisia .....	17
2.4 Ekstraksi dan Ekstrak .....	18
2.5 Enzim.....	21
2.5.1 Karakter Enzim.....	21
2.5.2 Penghambatan Aktivitas Enzim .....	25
2.6 Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase.....	27
2.7 Penentuan Kinetika Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase .....	28
2.8 Spektrofotometri UV-Vis .....	28
2.9 Pola Kromatogram, KLT dan Identifikasi.....	32
2.9.1 Pola Kromatogram.....	32
2.9.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	33
2.9.3 Penapisan Fitokimia .....	34
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>37</b>
3.1 Lokasi dan Waktu .....	37
3.2 Alat.....	37
3.3 Bahan .....	37

3.4.	Prosedur Pelaksanaan.....	38
3.4.1	Penyiapan Larutan Pereaksi.....	38
3.4.2	Rancangan Penelitian .....	42
3.4.3	Prosedur Kerja .....	43
3.4.4	Optimasi Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase .....	44
3.4.5	.....	
	Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase.....	45
3.4.6	.....	
	Uji Kinetika Penghambatan aktivitas $\alpha$ -Glukosidase .....	52
3.4.7	Pola Kromatogram dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi Aktif .....	53
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>56</b>
4.1.	Penyiapan Bahan Uji.....	56
4.1.1	Penyiapan Simplisia Uji.....	56
4.1.2	Ekstraksi Simplisia .....	57
4.1.3	Fraksinasi .....	58
4.2.	Optimasi Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase .....	59
4.3.	Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase.....	62
4.4.	Uji Kinetika Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase.....	66
4.5.	Pola Kromatogram dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi Aktif.....	67
<b>BAB 5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>72</b>
5.1.	Kesimpulan .....	72
5.2.	Saran .....	72
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>		<b>73</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Struktur Kimia Akarbose .....	14
Gambar 2.2.	Efek pH pada Aktivitas Enzim .....	22
Gambar 2.3.	Efek Konsentrasi Substrat pada Kecepatan Awal suatu Reaksi yang dikatalisis oleh Enzim .....	23
Gambar 2.4.	Plot Resiprokal Ganda atau Lineweaver-Burk digunakan untuk mengevaluasi Nilai $K_m$ dan $V_{max}$ .....	24
Gambar 2.5.	Plot Lineweaver-Burk yang menunjukkan Inhibisi Kompetitif .....	26
Gambar 2.6.	Plot Lineweaver-Burk yang menunjukkan Inhibisi Nonkompetitif ..	27
Gambar 2.7.	Reaksi enzimatis $\alpha$ -Glukosidase & p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida .....	27
Gambar 2.8.	Hubungan Konsentrasi Substansi Penyerap dengan Serapan.....	30
Gambar 2.9.	Instrumentasi Spektrofotometer UV-VIS.....	31
Gambar 3.1.	Timbangan Analitik .....	80
Gambar 3.2.	<i>Rotary Vacum Evaporator</i> .....	80
Gambar 3.3.	Inkubator .....	80
Gambar 3.4.	<i>Vortex Mixer</i> .....	81
Gambar 3.5.	Pipet Mikro .....	81
Gambar 3.6.	<i>Frezze Dry</i> .....	81
Gambar 3.7.	<i>Magnetic Stirrer</i> .....	81
Gambar 3.8.	Spektrofotometer UV-Vis .....	82
Gambar 4.1.	<i>Terminalia catappa</i> L.(Pohon Ketapang) .....	82
Gambar 4.2.	<i>Terminalia catappa</i> L.(Daun dan Buah Ketapang).....	83
Gambar 4.3.	Grafik Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Konsentrasi Substrat 0,625 mM hingga 30 mM .....	62
Gambar 4.4.	Plot Lineweaver-Burk Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Etil Asetat Buah Ketapang 0,125% (6,3ppm) .....	67
Gambar 4.5.	Kromatogram Flavonoid Fraksi Petroleum Eter dan Etil Asetat dengan Eluen Heksan : Etil Asetat saat sebelum (a.1-b.3) dan sesudah (c.1-c.3) disemprot Larutan Penampak Noda $AlCl_3$ .....	83
Gambar 4.6.	Kromatogram Flavonoid Fraksi Butanol dan Metanol-Air dengan Eluen Heksan : Metanol sebelum (a.1-a.3) dan sesudah (b.1-b.3) disemprot Larutan Penampak Noda $AlCl_3$ .....	84

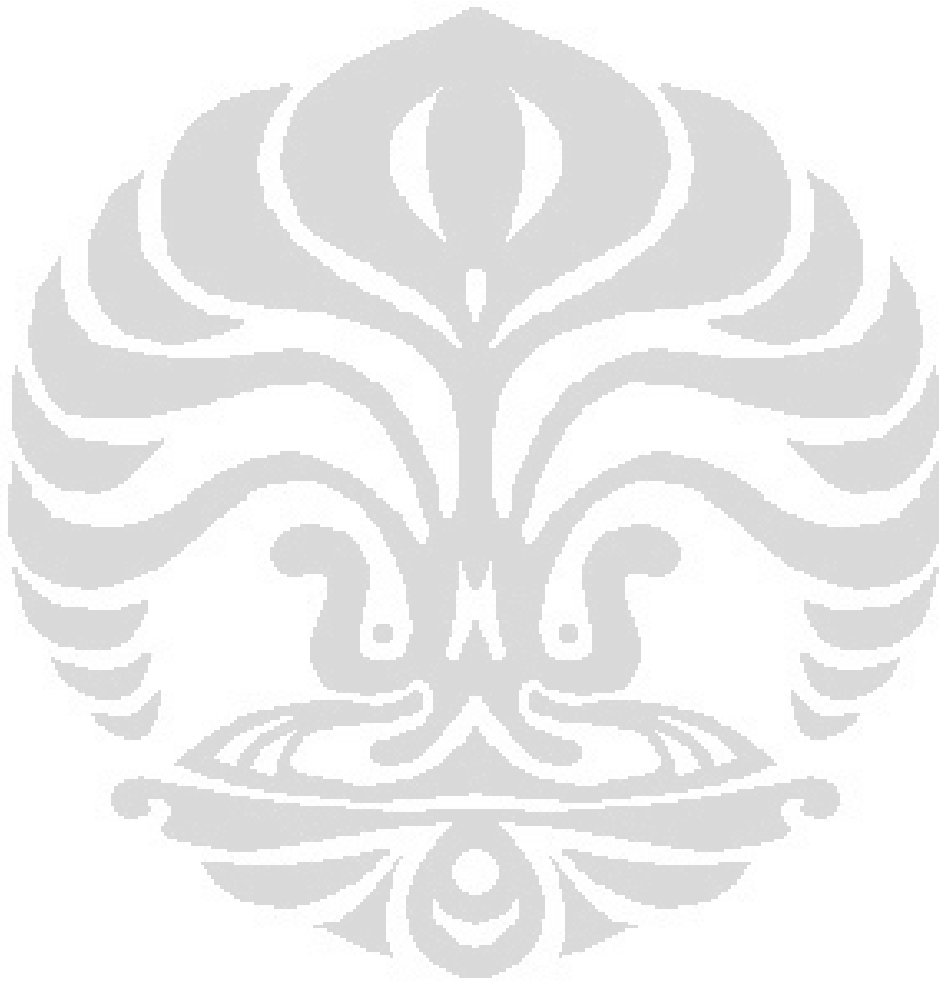
## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Kondisi Berdasarkan Kadar Glukosa Darah.....	6
Tabel 2.2.	Mula dan Masa Kerja Macam-Macam Sediaan Insulin .....	9
Tabel 2.3.	Zat Penyerap untuk Kromatografi Lapisan Tipis.....	33
Tabel 3.1.	Pengujian Aktivitas Larutan Enzim 0,0279 U/mL.....	45
Tabel 3.2.	Prosedur Optimasi pH .....	46
Tabel 3.3.	Prosedur Optimasi Waktu Inkubasi.....	47
Tabel 3.4.	Prosedur Optimasi Konsentrasi Substrat .....	48
Tabel 3.5.	Prosedur Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase .....	51
Tabel 3.6.	Prosedur Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim .....	52
Tabel 4.1.	Susut Pengeringan Tanaman Uji .....	85
Tabel 4.2.	Rendemen Ekstrak Etanol Tanaman Uji.....	85
Tabel 4.3.	Berat Ekstrak Hasil Fraksinasi .....	85
Tabel 4.4.	Pengujian Aktivitas Larutan Enzim 0,0279 U/mL.....	86
Tabel 4.5.	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Dapar Fosfat pH (6,0); (7,0); (7,2) ..	86
Tabel 4.6.	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Waktu Inkubasi 15; 20; 30 menit pada konsentrasi enzim 0,0279 U/mL, konsentrasi substrat 10 mM dan pH 7,0.....	86
Tabel 4.7.	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Konsentrasi Substrat 0,625 mM; 1,25 mM; 2,5mM; 5 mM; 15 mM; 10 mM; 20 mM; 30 mM pada konsentrasi enzim 0,0279U/mL, waktu inkubasi 15 menit dan pH 7,0.....	87
Tabel 4.8.	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Akarbose (sebagai Perbandingan).....	88
Tabel 4.9.	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Petroleum Eter ....	88
Tabel 4.10.	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Etil Asetat.....	89
Tabel 4.11.	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Butanol.....	89
Tabel 4.12.	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Metanol-Air .....	90
Tabel 4.13.	Hasil Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase .....	65
Tabel 4.14.	Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Enzim Fraksi Teraktif/ Etil Asetat.....	91
Tabel 4.15.	Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten Fraksi Etil Asetat 6,3 ppm .....	91
Tabel 4.16.	Hasil Identifikasi Golongan Senyawa Kimia.....	68
Tabel 4.17.	Hasil Perhitungan Harga Rf Fraksi Petroleum Eter dan Etil Asetat.....	92
Tabel 4.18.	Hasil Perhitungan Harga Rf Fraksi Butanol dan Metanol-Air.....	92



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Prosedur Pelaksanaan .....	93
Lampiran 2. Skema Persiapan Sampel dan Ekstraksi.....	94
Lampiran 3. Skema Fraksinasi .....	95
Lampiran 4. Skema Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase .....	96
Lampiran 5. Cara Perhitungan Unit Larutan $\alpha$ -Glukosidase .....	97
Lampiran 6. Surat Determinasi Tanaman.....	99
Lampiran 7. Sertifikat Analisis Enzim $\alpha$ -Glukosidase.....	100





# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia dan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin, penurunan sensitivitas insulin atau keduanya (Dipiro, Talbert, Yees, Matzke, Wells, & Posey, 2005). Diabetes melitus merupakan salah satu penyakit yang menyebabkan peningkatan resiko kematian / kesakitan dan penurunan kualitas hidup pasien (Adisakwattana, Lerdsuwankij, Poputtachai, Minipun, & Suparpprom, 2011).

Lebih dari 300 juta orang penderita diabetes, dan jumlah ini akan terus meningkat seiring dengan pertumbuhan populasi. Prevalensi diabetes global diperkirakan pada tahun 2030 jumlah penderita diabetes akan meningkat menjadi 439 juta. Diabetes merupakan penyakit kronis yang menyebabkan komplikasi serius seperti penyakit jantung, ginjal, ulkus pada kaki yang dapat mengakibatkan amputasi dan bahkan kematian dini di banyak negara, terutama negara-negara yang berpenghasilan rendah atau menengah (International Diabetes Federation, 2006).

Target terapi diabetes melitus adalah secara konsisten menormalkan kadar glukosa darah. Tujuan terapi diabetes melitus adalah untuk mengurangi kemungkinan terjadinya komplikasi jangka panjang mikrovaskular dan makrovaskular, meminimalkan kejadian hipoglikemik dan menjaga keseluruhan kualitas hidup pasien (Chisholm-Burns, *et al.*, 2008). Pengobatan diabetes dapat dilakukan dengan terapi nonfarmakologi dan terapi farmakologi. Terapi nonfarmakologi dilakukan dengan diet yang dikombinasikan dengan olahraga (jika memungkinkan), sedangkan terapi farmakologi dilakukan dengan terapi insulin dan terapi antidiabetes oral (Alwan, 1994).

Penghambat  $\alpha$ -glukosidase (contohnya : akarbose dan miglitol) merupakan salah satu golongan obat antidiabetes oral yang secara kompetitif menghambat kerja maltase, isomaltase, sukrase, dan glukamilase sehingga dapat menunda

penguraian sukrosa dan karbohidrat kompleks di usus halus. Efek utama yang timbul akibat aksi ini ialah dapat mengurangi peningkatan kadar glukosa darah *postprandial* (Dipiro, *et al.*, 2005).

Penelitian mengenai skrining penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada hasil alam (terutama tanaman) telah banyak dilakukan saat ini dengan tujuan untuk mengembangkan penemuan sumber obat alternatif baru yang lebih aman, efektif dan efisien bagi penderita diabetes (Joo, *et al.*, 2006). Pada penelitian *in vitro* terdahulu telah terbukti bahwa ekstrak etanol 80% dari buah ketapang (*Terminalia catappa* L.) memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tertinggi bila dibandingkan dengan 15 tanaman lain yang diuji dengan nilai  $IC_{50}$  3,02 ppm (Fitriana, 2011).

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka pada penelitian ini dilakukan uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase terhadap fraksi-fraksi buah ketapang sebagai obat antidiabetes dan identifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi yang aktif. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 80% dan dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan pelarut yang semakin meningkat kepolarannya secara berturut-turut dari pelarut nonpolar hingga pelarut polar yaitu petroleum eter, etil asetat, butanol dan metanol. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi karena metode maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi cara dingin yang mudah dilakukan karena alat / caranya sederhana, dan memungkinkan senyawa aktif yang terkandung di dalam simplisia tidak rusak karena cara dingin dapat digunakan untuk simplisia yang tahan / tidak tahan akan pemanasan.

Fraksinasi dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman pada beberapa fraksi sesuai tingkat kepolarannya, sehingga dapat memisahkan senyawa kimia yang tidak diharapkan dan diperoleh senyawa aktif yang diduga memiliki aktivitas penghambatan terhadap  $\alpha$ -glukosidase. Setiap fraksi yang diperoleh diuji aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase kemudian dibandingkan satu sama lain. Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dilakukan dengan metode *Spectrophotometric Stop Rate Determination*. Hasil penghambatan reaksi enzimatik tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang 400 nm. Nilai penghambatan ditetapkan dengan

menggunakan nilai  $IC_{50}$ , yaitu konsentrasi yang dapat menghambat 50% aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dalam kondisi pengujian. Fraksi yang aktif (fraksi dengan nilai  $IC_{50}$  yang lebih rendah dibandingkan dengan nilai  $IC_{50}$  pembanding) kemudian dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk diperoleh profil kromatogramnya dan diidentifikasi golongan senyawa kimianya.

## **1.2. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh fraksi dari ekstrak buah ketapang yang memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tertinggi dan mengetahui golongan senyawa kimia dari fraksi yang aktif tersebut.





## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Diabetes Melitus**

##### **2.1.1 Definisi & Klasifikasi**

**Diabetes mellitus (DM)** adalah gangguan metabolisme kronis yang disebabkan oleh defisiensi insulin absolut/ relatif atau resistensi sel terhadap insulin (Zanatta L, *et al.*, 2007). Diabetes mellitus yang ditandai dengan hiperglikemia dapat menyebabkan komplikasi seperti retinopati, neuropati, nefropati, dan penyakit jantung (Hsieh, *et al.*, 2010). Umumnya, diabetes melitus diklasifikasikan menjadi 4 tipe, diantaranya ialah sebagai berikut :

##### **2.1.1.1 Diabetes Melitus tipe 1**

Diabetes Melitus tipe 1 disebut juga *insulin-dependent diabetes mellitus* (IDDM), penyakit hiperglikemia akibat ketiadaan insulin. Secara umum, penyakit ini disebabkan karena destruksi otoimun sel-sel  $\beta$  pulau Langerhans (destruksi otoimun ini dapat timbul setelah infeksi virus atau setelah pajanan obat atau toksin), sehingga terjadi defisiensi insulin absolute (Sukandar, Andrajati, Sigit, Adnyana, Setiadi, & Kusnandar, 2008). Oleh karena itu pengobatan dasar diabetes melitus tipe 1, bahkan untuk tahap paling awal sekalipun, adalah penggantian insulin. Penderita Diabetes Melitus tipe 1 biasanya memiliki tubuh yang kurus dan cenderung berkembang menjadi diabetes ketoasidosis (DKA) karena defisiensi insulin disertai peningkatan hormon glukagon (Sukandar, *et al.*, 2008).

##### **2.1.1.2 Diabetes Melitus tipe 2**

Diabetes Melitus tipe 2 disebut juga sebagai *noninsulin dependent diabetes mellitus* (NIDDM), penyakit hiperglikemia yang ditandai dengan insensitivitas/ resistensi sel terhadap insulin dan defisiensi insulin relatif. Individu yang mengidap diabetes tipe 2 tetap menghasilkan insulin, namun sering terjadi keterlambatan dalam sekresi insulin setelah makan dan berkurangnya jumlah total insulin yang dikeluarkan. Hal ini cenderung semakin parah seiring dengan

pertambahan usia pasien. Umumnya pasien dengan diabetes mellitus tipe 2 sering asimtomatik. Beberapa faktor resiko diabetes mellitus tipe 2 adalah riwayat keluarga (faktor keturunan), obesitas, jarang olahraga, hipertensi, riwayat penyakit gangguan vaskuler dan diabetes mellitus gestasional (Dipiro, *et al.*, 2005). Pengobatan penyakit ini adalah dengan diet yang dikombinasikan dengan olahraga (khususnya bagi sebagian pasien diabetes mellitus tipe 2 dengan berat badan yang berlebih) atau pemberian obat antidiabetes oral.

### **2.1.1.3 Diabetes Melitus Gestasional**

Diabetes Melitus Gestasional (GDM) terjadi pada wanita hamil yang sebelumnya tidak mengidap diabetes. Sekitar 50% wanita pengidap kelainan ini akan kembali ke status nondiabetes setelah kehamilan berakhir. Penyebab diabetes gestasional dianggap berkaitan dengan peningkatan kebutuhan kadar estrogen, energi, dan hormon pertumbuhan selama kehamilan. Estrogen dan hormon pertumbuhan merangsang pengeluaran/penggunaan insulin secara terus-menerus dan berlebihan (seperti yang terjadi pada pasien diabetes tipe 2) yang akhirnya menyebabkan penurunan responsivitas sel terhadap insulin (Corwin, 2001). Diabetes gestasional dapat menimbulkan efek negatif pada kehamilan dengan meningkatkan risiko malformasi kongenital, lahir mati, dan bayi bertubuh besar, yang dapat menimbulkan masalah pada persalinan.

### **2.1.1.4 Diabetes Tipe Lain**

Selain dari 3 tipe diabetes melitus tersebut, terdapat tipe diabetes lainnya yaitu diabetes yang disebabkan oleh infeksi, efek samping obat, endokrinopati, kerusakan pankreas dan kelainan genetik (Dipiro, *et al.*, 2005).

## **2.1.2 Terapi Diabetes Melitus**

### **2.1.2.1 Target Terapi**

Target utama terapi diabetes melitus adalah secara konsisten menormalkan kadar glukosa darah, karena kadar glukosa darah yang mendekati kisaran normal dapat mengurangi kemungkinan terjadinya komplikasi mikrovaskular dan makrovaskular. Pengaturan kadar glukosa darah puasa dan kadar glukosa setelah



makan sangat penting untuk mencapai kadar glukosa mendekati normal (Abrahamson, 2004). Bastyr, *et al.* (2000) menyebutkan bahwa terapi diabetes yang terbaik adalah terapi yang lebih fokus terhadap penurunan kadar glukosa setelah makan daripada kadar glukosa puasa. Adapun kondisi berdasarkan kadar glukosa darah dapat dilihat pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.1.** Kondisi Berdasarkan Kadar Glukosa Darah

Parameter	mg/dL	mmol/L
<b>Glukosa puasa</b>		
Normal	<100	<5,6
<i>Impaired Fasting Glucose (IFG)</i>	100-125	5,6-6,9
Diabetes Melitus	≥126	≥7,0
<b>Glukosa setelah makan</b>		
Normal	<140	<7,8
<i>Impaired Glucose Tolerance (IGT)</i>	140-199	7,8-11,1
Diabetes Melitus	≥200	≥11,1

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

Glukosa puasa menggambarkan produksi glukosa di hati, yang bergantung pada kemampuan pankreas dalam sekresi insulin. Sedangkan glukosa setelah makan menggambarkan pengambilan glukosa oleh jaringan perifer (otot dan jaringan adiposa) yang bergantung pada sensitivitas jaringan perifer terhadap insulin (Dipiro, *et al.*, 2005).

Asupan makanan (karbohidrat) harus dimonitor untuk mencapai kadar glukosa darah yang mendekati normal. Asupan makanan yang terlalu banyak dapat menyebabkan hiperglikemia pada penderita diabetes melitus.

### 2.1.2.2 Terapi Nonfarmakologi

Penderita diabetes diharapkan dapat mengontrol kadar glukosa darah secara teratur dan mempertahankan berat badan yang normal. Hal ini dikarenakan pada penderita diabetes dengan berat badan berlebih, kadar glukosa darah sulit dikendalikan. Penurunan berat badan dapat mengurangi resistensi insulin dan

meningkatkan sensitivitas sel terhadap insulin. Adapun terapi nonfarmakologi yang dapat dilakukan untuk memperoleh berat badan dan kadar glukosa darah yang normal adalah:

#### **a. Diet**

Diet yang dianjurkan adalah makanan dengan komposisi yang seimbang sesuai kebutuhan gizi. Rencana diet diabetes dihitung secara individual bergantung pada kebutuhan pertumbuhan, rencana penurunan berat, dan tingkat aktivitas. Pada dasarnya diet ditujukan untuk mencapai dan mempertahankan berat badan yang ideal.

Sebagian pasien diabetes tipe 2 karena faktor kegemukan mengalami pemulihan kadar glukosa darah mendekati normal hanya dengan diet. Dari sisi makanan, penderita diabetes lebih dianjurkan mengonsumsi karbohidrat berserat dan menghindari konsumsi buah-buahan yang terlalu manis. Selain itu tingginya serat dalam sayuran akan menekan kenaikan kadar glukosa dan kolesterol darah (Corwin, 2001).

#### **b. Olahraga**

Olahraga yang disertai dengan diet dapat meningkatkan pemakaian glukosa oleh sel sehingga dapat menurunkan kadar glukosa dan berat badan yang pada akhirnya akan meningkatkan kepekaan sel terhadap insulin.

#### **c. Berhenti merokok**

Berhenti merokok merupakan salah satu terapi nonfarmakologi untuk penderita diabetes melitus. Nikotin yang terdapat pada rokok dapat mempengaruhi secara buruk penyerapan glukosa oleh sel. Merokok juga menghasilkan banyak radikal bebas. Banyak indikasi menunjukkan bahwa pada penderita diabetes, metabolisme glukosa yang terganggu menimbulkan kelebihan radikal bebas, yang memegang peranan penting pada terjadinya komplikasi lambat (Tjay & Rahardja, 2007).

### 2.1.2.3 Terapi Farmakologi

Terapi farmakologi untuk penyakit diabetes melitus adalah terapi injeksi dan terapi antidiabetik oral. Terapi injeksi meliputi insulin, *incretin mimetics* (GLP-1), dan *incretin enhancers* (DPP-4). Sedangkan terapi antidiabetik oral meliputi agen penginduksi sekresi insulin (sulfonilurea), biguanida, tiazolindindion (TZD), dan agen penghambat  $\alpha$ -glukosidase. Antidiabetik oral diindikasikan bagi pasien diabetes tipe 2 jika diet dan olahraga tidak cukup menurunkan kadar gula darah yang tinggi.

#### a. Insulin

Sediaan insulin umumnya diperoleh dari sapi atau babi. Dengan berbagai teknik isolasi dan modifikasi diperoleh bermacam-macam sediaan dengan sifat yang berbeda berdasarkan mula dan masa kerjanya (Tabel 2.2) , diantaranya: insulin mula kerja cepat dengan masa kerja singkat (*rapid-acting insulin*), insulin mula kerja cepat (*short-acting insulin*), insulin masa kerja sedang (*intermediate-acting insulin*), dan insulin masa kerja panjang (*long-acting insulin*). Setiap kategori insulin memiliki onset, puncak dan durasi kerjanya masing-masing yang sangat penting untuk memprediksi dosis pemberian insulin, karena setiap individu pasien memiliki respon yang berbeda terhadap bermacam-macam dosis insulin.

Sediaan insulin *lispro* dan *aspart* merupakan *rapid-acting insulin* yang diberikan secara parenteral sebelum atau saat makan untuk mencegah peningkatan kadar glukosa darah *postprandial*. Sedangkan sediaan *short-acting insulin* merupakan insulin yang diberikan secara intravena. Sediaan *intermediate-acting insulin* meliputi *NPH* dan *Lente*. *NPH* diabsorpsi secara lambat karena *NPH* berkonjugasi dengan protamin yang membentuk kompleks yang kurang larut. Insulin *lente* adalah campuran antara insulin *semilente* dan insulin *ultralente* yang keduanya bekerja secara sedang dan durasinya cukup lama.

Sediaan insulin yang memiliki masa kerja panjang adalah insulin *glargine* dan insulin *ultralente*. Insulin *glargine* diberikan secara subkutan. Insulin *ultralente* adalah insulin dengan durasi lama dan jarang digunakan karena dikhawatirkan terjadinya akumulasi obat.

**Tabel 2.2.** Mula dan Masa Kerja Macam-Macam Sediaan Insulin

Kategori Insulin		Onset (jam)	Puncak (jam)	Durasi (jam)
<b>Rapid-acting</b> insulin mula kerja cepat dengan masa kerja singkat	<i>Lispro</i>	0,25-0,5	0,5-2,5	≤5
	<i>Aspart</i>	<0,20	1-3	3-5
	<i>Glulisine</i>	<0,20	1-3	3-5
<b>Short-acting</b> insulin masa kerja cepat	<i>Regular</i>	0,5-1	2-3	3-6
<b>Intermediate-acting</b> insulin masa kerja sedang	<i>NPH</i>	2-4	4-10	10-16
	<i>Lente</i>	3-4	4-12	12-18
<b>Long-acting</b> insulin masa kerja panjang	<i>Ultralente</i>	6-10	10-16	18-20
	<i>Glargine</i>	1-2	-	>24
	<i>Detemir</i>	1-2	-	>24

[Sumber: Linn, Wofford, O'Keefe, & Posey, 2009]

Mekanisme kerja insulin adalah menurunkan kadar glukosa darah dengan menstimulasi pengambilan glukosa perifer dan menghambat produksi glukosa hepatic (Sukandar, *et al.*, 2008). Efek samping yang sering terjadi pada penggunaan insulin adalah hipoglikemik dan berat badan bertambah (Dipiro, *et al.*, 2005).

Sediaan insulin biasanya diberikan secara kombinasi antara *intermediate-acting insulin* dengan *rapid-acting insulin* atau *short-acting insulin*, contohnya: 70/30-NPH dan Regular, Humalog 75/25-NPL dan lispro, Novolog 70/30-NPA dan aspart). Selain itu insulin dapat digunakan sebagai terapi tunggal pengobatan

diabetes mellitus atau dikombinasikan dengan antidiabetik oral, tergantung pada kebutuhan individu pasien untuk mengoptimalkan kontrol glukosa darah.

**b. *Incretin mimetics / Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide (GIP) dan Glukagon-Like Peptide Reseptor Agonist (GLP-1)***

*Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide (GIP)* dan *Glukagon-Like Peptide (GLP-1)* merupakan hormon yang disekresikan oleh sel endokrin di epitelium usus kecil. Keduanya berfungsi untuk mengatur kontrol glukosa darah dan memperbaiki fungsi keseimbangan antara glukagon dan insulin. *Glukagon-Like Peptide (GLP-1)* adalah hormon yang menstimulasi insulin, menghambat sekresi glukagon, menghambat pengosongan lambung, dan mengurangi nafsu makan. Contoh GLP-1 agonis adalah *exenatid* dan *pramlintid*. Penggunaan *exenatid* adalah dengan diinjeksikan secara subkutan dua kali sehari pada penderita diabetes tipe 2. *Pramlintid* adalah analog peptida sintetik pertama. Efek samping yang sering terjadi pada penggunaan GLP-1 adalah mual, muntah dan diare (Linn, Wofford, O'Keefe, & Posey, 2009).

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

Penghambat Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) menghambat kerja DPP-4 dalam menguraikan inkretin. Penghambat Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) juga bekerja seperti GLP-1 yaitu menstimulasi insulin dan menghambat sekresi glukagon, namun penghambat Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) tidak menghambat pengosongan lambung. Contoh penghambat Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) adalah *sitagliptin*, *saxagliptin*, dan *vildagliptin*. Penghambat Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) memiliki waktu paruh yang panjang, kecuali *vildagliptin*. Penghambat Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) dapat digunakan sebagai terapi tunggal atau dikombinasikan dengan metformin atau pioglitazon. Efek samping yang sering terjadi pada penggunaan Penghambat Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) adalah diare, mual, muntah dan sakit kepala (Linn, Wofford, O'Keefe, & Posey, 2009).

#### **d. Sulfonilurea**

Sulfonilurea digolongkan menjadi 2 generasi, generasi pertama (tolbutamid, tolazamid, dan klorpropamid) dan generasi kedua (gliburid, glipizid, dan glimepirid). Keduanya memiliki efektivitas yang sama ketika diberikan dalam dosis yang sesuai. Saat ini umumnya pasien DM diberikan sulfonilurea generasi kedua karena memiliki potensi hipoglikemik yang lebih besar dibanding sulfonilurea generasi pertama. Mekanisme kerja sulfonilurea adalah merangsang sekresi insulin pada pankreas (Sukandar, *et al.*, 2008). Sulfonilurea dapat digunakan sebagai terapi tunggal atau dikombinasikan dengan antidibetik oral lainnya / insulin (Linn, Wofford, O'Keefe, & Posey, 2009). Efek samping dari sulfonilurea adalah hipoglikemik, berat badan bertambah dan hiponatremia (Dipiro, *et al.*, 2005).

#### **e. Biguanida**

Metformin, fenformin dan buformin merupakan obat golongan biguanida, namun fenformin dan buformin telah ditarik dari peredaran karena menyebabkan asidosis laktat. Mekanisme kerjanya adalah dengan menghambat glukoneogenesis dan meningkatkan penggunaan glukosa di jaringan (Sukandar, *et al.*, 2008). Metformin tidak mempengaruhi pelepasan insulin dari sel  $\beta$  pankreas, sehingga tidak menyebabkan hipoglikemia (Chisholm-Burn, *et al.*, 2008). Efek samping dari biguanida adalah gangguan gastrointestinal meliputi diare dan rasa tidak nyaman pada perut (Dipiro, *et al.*, 2005). Penggunaan metformin dapat dikombinasikan dengan obat golongan antidiabetik oral lainnya. Penggunaan metformin dikontraindikasikan pada penderita dengan gangguan fungsi ginjal dan hati (Linn, Wofford, O'Keefe, & Posey, 2009).

#### **f. Tiazolidindion**

Dua obat yang termasuk golongan tiazolidindion adalah pioglitazon dan rosiglitazon. Mekanisme kerjanya adalah meningkatkan sensitivitas insulin pada otot dan jaringan adiposa (Sukandar, *et al.*, 2008). Farmakokinetik tiazolidindion tidak dipengaruhi oleh makanan (Dipiro, *et al.*, 2005). Efek samping dari tiazolidindion adalah udem. Terapi kombinasi dengan insulin akan meningkatkan

kemungkinan terjadinya udem (Dipiro, *et al*, 2005). Penggunaan tiazolidindion dapat digunakan sebagai terapi tunggal atau dikombinasikan dengan obat golongan antidiabetik oral lainnya. Penggunaan tiazolidindion dikontraindikasikan pada ibu hamil dan penderita dengan gangguan fungsi hati (Linn, Wofford, O'Keefe, & Posey, 2009).

#### **g. Penghambat $\alpha$ -Glukosidase**

$\alpha$ -Glukosidase adalah enzim yang bertanggung jawab terhadap penguraian disakarida dan karbohidrat kompleks menjadi glukosa. Disakarida dan karbohidrat kompleks akan dicerna oleh enzim di dalam mulut dan usus menjadi gula yang lebih sederhana, kemudian diserap ke dalam tubuh dan meningkatkan kadar gula darah (Chisholm-Burn, *et al.*, 2008).  $\alpha$ -Glukosidase merupakan enzim yang berada di sepanjang dinding usus halus. Enzim yang terpenting adalah maltase yang menghidrolisis maltosa, sukrase yang menghidrolisis sukrosa, dan isomaltase yang mengkatalisis pemecahan maltotriosa. Selain itu, terdapat glukamilase yang dapat melepas satu residu gula dari ujung dekstrin yang tidak tereduksi (Coulson, 1994). Penghambatan pada enzim ini dapat menunda penyerapan glukosa pada saluran pencernaan, sehingga dapat mencegah peningkatan konsentrasi glukosa darah setelah makan (Chisholm-Burn, *et al.*, 2008).

Enzim yang telah digunakan pada pengujian penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase adalah  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari beberapa sumber yang berbeda, diantaranya: mamalia (usus tikus), bakteri (*Bacillus stearothermophilus*), ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) (Shinde, *et al.*, 2008) dan tanaman (Zeng & Elbein, 1998). Persamaan dari enzim-enzim tersebut adalah sama-sama memiliki kemampuan mengkatalisis hidrolisis substrat/ karbohidrat. Berdasarkan literatur,  $\alpha$ -glukosidase yang berasal ketiga sumber tersebut memiliki kesamaan pada spesifitas substrat, sensitivitas terhadap inhibitor, dan pH optimum (Dhanawansa, Faridmoayer, Merwe, Li & Scaman, 2002). Namun terdapat perbedaan sensitivitas enzim yang berasal dari mamalia dan enzim yang berasal dari tanaman terhadap *N-ethylmaleimide* (NEM) dan *diethyl pyrocarbonate* (DEPC), yang bereaksi secara spesifik dengan residu sistein dan histidin (*active site*). Enzim

yang berasal dari mamalia lebih sensitif terhadap *N-ethylmaleimide* (NEM) daripada *diethyl pyrocarbonate* (DEPC), sedangkan enzim yang berasal dari tanaman menunjukkan hal yang sebaliknya. Adapun perbedaan antara enzim yang berasal dari mamalia dengan enzim yang berasal dari ragi adalah enzim yang berasal dari ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) sensitif terhadap histidin namun tidak sensitif terhadap sistein (Dhanawansa, Faridmoayer, Merwe, Li & Scaman, 2002). Pada penelitian lain menunjukkan bahwa enzim yang berasal dari ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) yang menggunakan *diethyl pyrocarbonate* (DEPC) dan *tetranitromethan* (TNM) bereaksi secara spesifik dengan residu tirosin dan histidin (*active site*) (Faridmoayer, & Scaman, 2005).  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* telah banyak digunakan pada beberapa pengujian penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase (Dewi, *et al.*, 2007; Wafo, *et al.*, 2011; Sugeng, Triadi, Rizna & Kazuko, 2002; Dhanawansa, Faridmoayer, Merwe, Li & Scaman, 2002).

Obat yang termasuk golongan penghambat  $\alpha$ -glukosidase adalah akarbose dan miglitol. Mekanisme keduanya adalah dengan menghambat  $\alpha$ -glukosidase sehingga mencegah penguraian sukrosa dan karbohidrat kompleks dalam usus halus dengan demikian akan memperlambat dan menghambat penyerapan glukosa (Sukandar, *et al.*, 2008). Studi klinis telah membuktikan bahwa penghambat  $\alpha$ -glukosidase efektif dalam mengontrol kadar glukosa puasa dan kadar glukosa *postprandial* pada pasien diabetes (Holman, *et al.*, 1999). Adapun senyawa yang telah diuji dapat menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase selain akarbose adalah miglitol dan 1-deoxyinojirimycin (Shinde, *et al.*, 2008). 1-deoxyinojirimycin menghambat aktivitas  $\alpha$ -1,6-glukosidase (Nishida, *et al.*, 2000). Sedangkan miglitol merupakan turunan dari 1-deoxyinojirimycin (Sels, J.P.J., Huijberts, M.S.P., & Wolffenbuttel, B.H.R, 1999).

Penghambat  $\alpha$ -glukosidase merupakan salah satu golongan obat antidiabetes oral yang bekerja dengan menghambat penguraian karbohidrat kompleks sehingga dapat menunda penyerapan glukosa. Agen penghambat  $\alpha$ -glukosidase dapat digunakan sebagai terapi tunggal atau dikombinasikan dengan pengobatan diabetes lain (Linn, Wofford, O'Keefe, & Posey, 2009). Agen penghambat  $\alpha$ -glukosidase tidak seefektif antidiabetik oral golongan lain bila



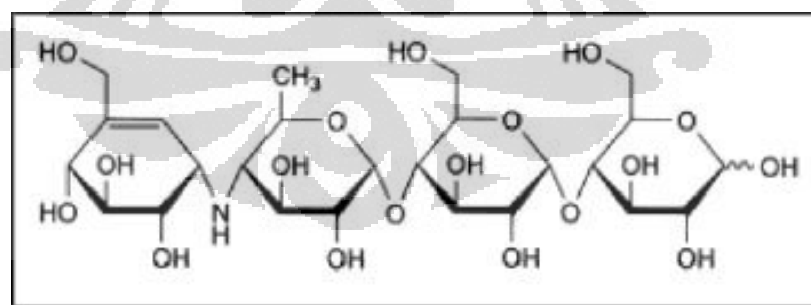
digunakan sebagai terapi tunggal. Namun apabila dikombinasikan dengan antidiabetik oral golongan lain, keefektivannya akan meningkat.

Penghambat  $\alpha$ -glukosidase dikontraindikasikan pada pasien dengan *short-bowel syndrome* atau inflamasi di usus besar (Dipiro, *et al.*, 2005). Hal ini dikarenakan penghambat  $\alpha$ -glukosidase menimbulkan efek samping pada sistem gastrointestinal seperti diare, pembentukan gas berlebihan di lambung atau usus, dan rasa tidak nyaman pada perut (Chisholm-Burn, *et al.*, 2008).

Salah satu obat yang termasuk golongan penghambat  $\alpha$ -glukosidase adalah akarbose. Akarbose merupakan obat golongan penghambat  $\alpha$ -glukosidase yang paling sering digunakan untuk terapi diabetes mellitus tipe 2 apabila diet tidak cukup menurunkan kadar glukosa darah (Holman, *et al.*, 1999).

Akarbose merupakan suatu pseudotetrasakarida yang diperoleh dari proses fermentasi mikroorganisme *Actinoplanes utahensis* (Bayer, 2008). Akarbose berupa serbuk berwarna putih dengan berat molekul 646 dan pKa 5,1 yang bersifat larut dalam air.

Nama kimia akarbose adalah *O-4,6-Dideoxy-4-[[[(1S,4R,5S,6S)-4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)cyclohex-2-enyl]amino] $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose* (British Pharmacopoeia, 2008). Rumus empirik akarbose adalah  $C_{25}H_{43}NO_{18}$  dengan struktur kimia sebagai berikut:



[Sumber : British Pharmacopoeia, 2008]

**Gambar 2.1.** Struktur Kimia Akarbose

Akarbose merupakan pseudotetrasakarida yang memiliki ikatan nitrogen diantara unit glukosa pertama dan kedua. Gugus nitrogen penting untuk afinitas

dan stabilitas akarbose terhadap  $\alpha$ -glukosidase. Akarbose bekerja sebagai penghambat kompetitif dengan menghalangi reaksi enzimatik khususnya karena adanya gugus nitrogen pada senyawa tersebut (Goldstein, 2008).

Efek samping yang sering terjadi pada penggunaan akarbose adalah diare dan pembentukan gas berlebihan di lambung. Cara untuk mengurangi efek samping tersebut adalah dengan pemberian dosis dimulai dari dosis rendah, kemudian ditingkatkan dosisnya secara bertahap (Linn, Wofford, O'Keefe, & Posey, 2009). Dosis akarbose dimulai dengan dosis rendah (25 mg satu kali sehari), kemudian ditingkatkan secara bertahap setelah beberapa bulan sampai dosis maksimum (50 mg tiga kali sehari untuk pasien dengan berat badan  $\leq$  60kg atau 100 mg tiga kali sehari untuk pasien dengan berat badan  $>$  60 kg) (Dipiro, *et al.*, 2005). Akarbose diproduksi oleh Bayer dengan nama dagang *Glucobay* (ISFI, 2007). Akarbose mempengaruhi kadar glukosa pada waktu makan sehingga akarbose diberikan bersamaan dengan makanan /pada saat makan.

## 2.2 *Terminalia catappa* L. (Ketapang)

### 2.2.1 Klasifikasi (Jones, & Luchsinger, 1987)

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Myrtales
Suku	: Combretaceae
Marga	: <i>Terminalia</i>
Jenis	: <i>Terminalia catappa</i> L.
Sinonim	: <i>Terminalia moluccana</i> Lamk.

*Terminalia procera* Roxb.

*Terminalia latifolia* Blanco, non Swartz.

Nama Daerah : Ketapang, ketapas, katafa (Sumatera). Ketapang, katapang (Jawa). Katapang, klihi (Nusa Tenggara). Tarisei, salrise, atapang (Sulawesi). Wewa, sarina, sertalo (Maluku). Ruge (Irian) (*Materia Medika*, 1989).

## 2.2.2

### 2.2.3 Morfologi

Pohon ketapang berukuran besar, tinggi hingga 40 m dan diameter batangnya 2 m. Kulit kayu sepat, terdapat banyak damar. Daun-daun yang serupa kulit, licin di bagian atas dan berambut halus di bagian bawah, tersebar di ujung ranting. Bunga berukuran kecil, terkumpul dalam bulir dekat ujung ranting dan berwarna hijau kekuningan. Buah berbentuk telur gepeng, keras, berwarna hijau/kuning/merah, atau berwarna ungu kemerahan jika buah sudah masak. Daging buahnya dapat dimakan tapi berserabut. Di dalam buah ketapang terdapat biji yang berbentuk jorong, bagian ujung agak meruncing dan agak pipih, sedangkan bagian pangkal membulat (Heyne, 1987).

### 2.2.4 Ekologi, Penyebaran dan Budidaya

Ketapang merupakan tumbuhan asli Asia Tenggara dan biasa ditanam di Australia bagian utara, India, Pakistan, Madagaskar, Afrika Timur, Afrika Barat, Amerika Tengah dan Amerika Selatan. Pohon ketapang cocok tumbuh di daerah panas, dataran rendah, dan dekat pesisir hingga ketinggian sekitar 800 m di atas permukaan laut. (Heyne, 1987). Ketapang menggugurkan daunnya hingga dua kali dalam setahun. Buah ketapang umumnya disebar oleh kelelawar.

### 2.2.5 Kandungan Kimia

Secara umum kandungan kimia yang terkandung pada tanaman ketapang adalah tannin (puni-calagin, punicalin, terflavin A dan B, tergallagin, ter-catain, asam chebulagic, geranin, granatin B, corilagin), flavonoid (isovitexin, vitexin, isoorientin, rutin), dan triterpenoid (Ahmed, *et al.*, 2005).

Kayu dan kulit kayu pohon ketapang mengandung tanin, katekin, epikatekin, asam galat, leukosianidin (Lemmens, & Soetjipto, 1992). Daun mengandung banyak tannin, flavonoid, saponin, triterpenoid, fitosterol (Ahmed, *et al.*, 2005). Pada daging buah terdapat 5% protein. Pada biji kering terdapat sebagian besar minyak yang terdiri atas beberapa asam lemak diantaranya asam palmitat 55,5%, asam oleat 23,3%, asam linoleat 7,6%, asam stearat 6,3%, dan

asam miristat 1,6%. Selain itu, pada biji kering juga terdapat protein 25% (Lemmens, & Soetjipto, 1992).

Buah ketapang mengandung sianidin-3-glukosida, corilagin (Hecht, *et al.* 1992), asam elagat (Tan, *et al.*, 1991), asam galat (Dorsch, 1991), pentosan, triterpenoid, dan tannin. Sedangkan pada buah ketapang beserta bijinya terbukti mengandung alkaloid, terpen, tannin dan glikosida (Fitriana, 2011).

### 2.2.6 Manfaat

Ketapang adalah tanaman yang multiguna (Lemmens, & Soetjipto, 1992). Akar ketapang berperan sebagai obat antiflogistika/obat pencegah radang, obat pada pendarahan, radang selaput lendir usus dan disentri. Kayunya biasa digunakan dalam pembuatan perahu dan peralatan rumah. Kulit kayu sepat, banyak digunakan sebagai obat sariawan dan radang selaput lendir usus karena kaya akan damar (Sastroamidjojo, 1997).

Daun ketapang biasanya digunakan secara tradisional sebagai obat reumatik (obat luar), malaria, panas, dan influenza (*Medicinal Herb*, 1986). Kulit kayu dan daunnya digunakan untuk menyamak kulit, mencat hitam kain dan membuat tinta, karena kulit kayu mengandung zat samak 9-12%, sedangkan pada daun terdapat zat samak dan tanin. Ekstrak daun dan kulit kayu juga berperan sebagai antikanker, antioksidan, antiinflamasi, dan antihepatitis (Ahmed, *et al.*, 2005). Inti biji berperan sebagai pencahar/laksantia (Depkes RI, 1989), sebagai obat penggiat fungsi kelenjar susu (Sastroamidjojo, 1997).

Buah ketapang berperan sebagai obat tekanan darah tinggi (*Medicinal Herb*, 1986). Namun penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa ekstrak etanol 80% dari buah ketapang memiliki aktivitas penghambat  $\alpha$ -glukosidase tertinggi bila dibandingkan dengan 15 tanaman lain yang diuji (Fitriana, 2011). Hal ini mungkin disebabkan karena tanaman ketapang mengandung tannin yang memiliki aktivitas antidiabetes (Teotia, 1997). Bagian tanaman ketapang yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian buah beserta bijinya.

### **2.3 Simplisia**

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun, dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan alam yang dikeringkan. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman tertentu, atau eksudat tanaman. Simplisia nabati harus bebas dari serangga, fragmen hewan, atau kotoran hewan; tidak boleh menyimpang bau dan warnanya; tidak boleh mengandung lendir dan cendawan, atau menunjukkan tanda-tanda pengotoran lain; tidak boleh mengandung bahan lain yang beracun atau berbahaya. Jika dalam beberapa hal khusus ada sedikit penyimpangan dari beberapa ketentuan mengenai morfologik dan mikroskopik yang tertera dalam *Materia Medika Indonesia*, sedangkan semua persyaratan lain dipenuhi, maka simplisia yang bersangkutan dapat dianggap memenuhi persyaratan *Materia Medika Indonesia* (Depkes RI, 1995).

### **2.4 Ekstraksi dan Ekstrak**

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan senyawa kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Pada ekstraksi bahan aktif dari simplisia, pelarut harus berdifusi dan senyawa aktif harus cukup larut dalam pelarut, sehingga akan tercapai kesetimbangan antara larutan (zat yang terlarut, solut) dan pelarut. Kecepatan untuk mencapai kesetimbangan tersebut umumnya tergantung pada suhu, pH, ukuran partikel, dan gerakan partikel (Depkes RI, 2000). Berikut adalah dua cara ekstraksi:

#### **2.4.1 Cara Dingin**

##### **2.4.1.1 Maserasi**

Maserasi adalah proses mengekstrakkan simplisia dengan menggunakan pelarut selama waktu tertentu dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya.

Kelebihan dari metode ini adalah alat dan caranya sederhana, juga dapat digunakan untuk simplisia yang tahan dan tidak tahan akan pemanasan. Kekurangan dari metode ini adalah waktu yang diperlukan untuk mengekstraksi sampel cukup lama dan pelarut yang dibutuhkan cukup banyak.

#### **2.4.1.2 Perkolasi**

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru, sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Kelebihan dari metode ini adalah dapat digunakan untuk simplisia yang tahan dan tidak tahan akan pemanasan. Kekurangan dari metode ini adalah membutuhkan waktu yang lama dan pelarut dalam jumlah yang banyak. Keberhasilan proses perkolasi dipengaruhi oleh selektivitas pelarut, kecepatan aliran pelarut, dan temperatur.

#### **2.4.2 Cara Panas**

##### **2.4.2.1 Refluks**

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna. Kelebihan dari metode ini adalah dapat digunakan untuk mengekstraksi simplisia yang tahan terhadap pemanasan langsung, proses ekstraksi lebih cepat, dan jumlah hasil ekstraksi yang diperoleh lebih banyak.

##### **2.4.2.2 Soxhlet**

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru, umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Kelebihan dari metode ini adalah dapat digunakan untuk mengekstraksi simplisia yang tidak tahan terhadap pemanasan langsung secara sempurna. Kekurangan dari metode ini adalah terbatas pada ekstraksi dengan pelarut murni dan tidak dapat digunakan untuk

ekstraksi dengan campuran pelarut, misalnya heksan : diklormetan = 1:1, atau pelarut yang diasamkan atau dibasakan.

#### **2.4.2.3 Digesti**

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50<sup>0</sup>C. Kelebihan dari metode ini adalah dapat digunakan untuk simplisia yang tidak tersari dengan baik pada temperatur ruangan (kamar).

#### **2.4.2.4 Infus**

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98<sup>0</sup>C) selama waktu tertentu (15-20 menit). Kelebihan dari metode infus adalah metode ini merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana, alat dan cara yang digunakan sederhana, efisien, dan hanya membutuhkan waktu yang singkat. Kekurangan dari metode ini adalah ekstrak yang diperoleh kurang stabil dan mudah tercemar oleh bakteri dan jamur, sehingga tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam pada suhu kamar.

#### **2.4.2.5 Dekok**

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama ( $\geq 30$  menit) dan temperatur sampai titik didih air. Kelebihan dari metode infus adalah metode ini merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana, alat dan cara yang digunakan sederhana, efisien, dan hanya membutuhkan waktu yang singkat. Kekurangan dari metode ini adalah ekstrak yang diperoleh kurang stabil dan mudah tercemar oleh bakteri dan jamur, sehingga tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam pada suhu kamar.

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Faktor-faktor yang harus dipertimbangkan dalam pemilihan pelarut

adalah selektivitas, kemudahan bekerja, ekonomis, ramah lingkungan, dan keamanan.

Proses ekstraksi akan menghasilkan produk yang disebut dengan ekstrak. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 2000).

## 2.5 Enzim

### 2.5.1 Karakter Enzim

Enzim adalah katalis yang dapat mempercepat reaksi tanpa mengalami perubahan secara permanen sebagai konsekuensi dari keikutsertaannya dalam reaksi yang bersangkutan. Enzim merupakan katalis yang sangat selektif, efisien dan spesifik. Enzim bersifat spesifik dalam bereaksi dengan satu atau beberapa substrat dan hanya mengkatalisis satu macam reaksi kimia. Untuk dapat bekerja terhadap suatu substrat, harus ada hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat pada bagian aktif enzim (*active site*) sehingga menghasilkan kompleks enzim-substrat (ES) yang bersifat sementara dan akan terurai jika reaksi yang diinginkan telah terjadi. Secara sederhana, hipotesis Michaelis dan Menten mengenai perubahan suatu substrat yang dikatalisis oleh enzim dapat digambarkan sebagai berikut:



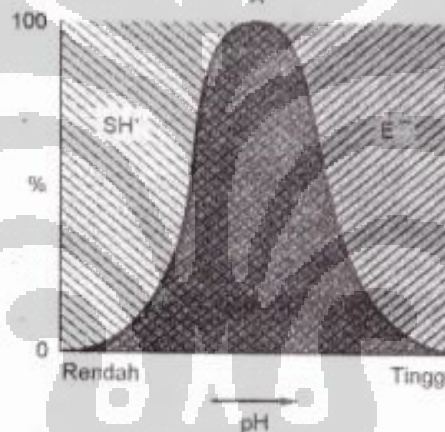
Keterangan: E = enzim, S = substrat, ES = kompleks enzim-substrat, P = produk/ hasil reaksi.

Enzim yang mengkatalisis perubahan satu atau lebih senyawa (substrat) menjadi satu atau lebih senyawa lain (produk) meningkatkan laju reaksi setidaknya  $10^6$  kali lebih cepat dibandingkan jika tanpa dikatalisis. Laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah suhu, pH, dan konsentrasi substrat (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).



Peningkatan suhu akan meningkatkan laju baik reaksi yang tidak dikatalisis maupun yang dikatalisis oleh enzim dengan meningkatkan energi kinetik dan frekuensi tumbukan molekul-molekul yang bereaksi. Namun, energi panas juga dapat meningkatkan energi kinetik enzim hingga ke suatu titik yang melebihi hambatan energi untuk merusak interaksi nonkovalen yang mempertahankan struktur enzim. Rantai polipeptida enzim kemudian mulai terurai / mengalami denaturasi, disertai hilangnya kemampuan katalitik enzim.

Sebagian besar enzim memperlihatkan aktivitas optimal pada pH antara 5 dan 9. Hubungan aktivitas dengan konsentrasi ion hidrogen (Gambar 2.2.) mencerminkan keseimbangan antara denaturasi enzim pada pH tinggi atau rendah dan efek pada keadaan bermuatan dari enzim, substrat atau keduanya.

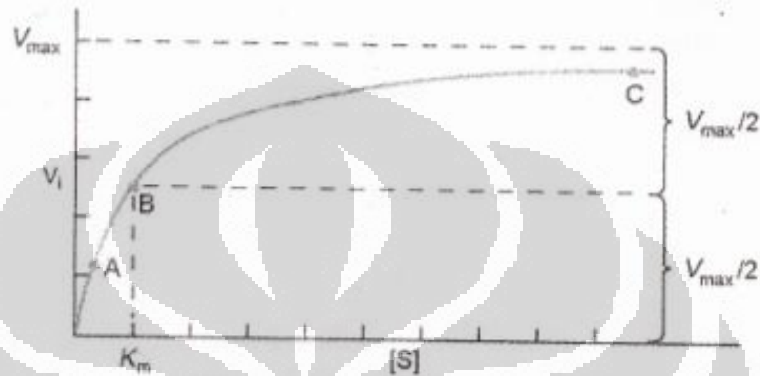


[Sumber : Murray, Granner, & Rodwell, 2009]

**Gambar 2.2.** Efek pH pada Aktivitas Enzim

Peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan  $v_i$  (*initial velocity*/ kecepatan awal) hingga tercapai kecepatan maksimal  $V_{max}$  (Gambar 2.3). Jika peningkatan konsentrasi substrat lebih lanjut tidak meningkatkan  $v_i$ , enzim dikatakan “jenuh” oleh substrat. Bentuk kurva yang menghubungkan aktivitas dengan konsentrasi substrat tampak hiperbolik (Gambar 2.3). Pada setiap saat, hanya molekul substrat yang berikatan dengan enzim dalam bentuk kompleks ES yang dapat diubah menjadi produk. Oleh karena itu, jika terdapat kelebihan substrat (titik A dan B), hanya sebagian enzim yang mungkin berada dalam bentuk kompleks ES. Dengan demikian, di titik A atau B, peningkatan atau

penurunan [S] akan meningkatkan atau menurunkan jumlah kompleks ES disertai perubahan yang sesuai di  $v_i$ . Di titik C, pada hakikatnya semua enzim terdapat dalam bentuk kompleks ES. Karena tidak ada enzim bebas yang tersedia untuk membentuk ES, peningkatan [S] lebih lanjut tidak dapat meningkatkan laju reaksi.



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

**Gambar 2.3.** Efek Konsentrasi Substrat pada Kecepatan Awal Suatu Reaksi yang dikatalisis oleh Enzim

Persamaan Michaelis-Menten memperlihatkan secara matematis hubungan antara kecepatan awal reaksi ( $v_i$ ) yang bervariasi dengan variasi konsentrasi substrat

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

Keterangan :  $v_i$  = Kecepatan awal reaksi,  $V_{max}$  = Kecepatan reaksi maksimal, [S]=Konsentrasi substrat,  $K_m$  = Konstanta Michaelis

Konstanta Michaelis ( $K_m$ ), adalah konsentrasi substrat dengan kecepatan awal reaksi ( $v_i$ ) adalah separuh dari kecepatan maksimal ( $V_{max}/2$ ) yang dapat dicapai pada konsentrasi tertentu enzim. Bentuk linier persamaan Michaelis-Menten (Murray, Granner, & Rodwell, 2009, hal.70-71) digunakan untuk menentukan  $V_{max}$  dan  $K_m$ . Dimulai dari persamaan (2.1),

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

dibalik

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

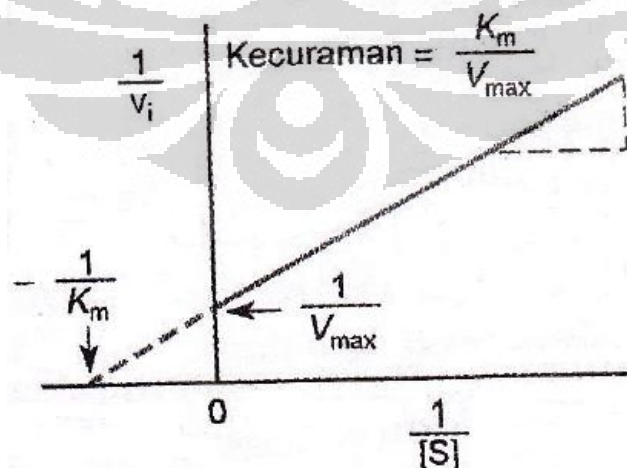
faktor

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

dan disederhanakan

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

Persamaan (2.4) adalah persamaan dalam suatu garis lurus,  $y = a + bx$ , di mana  $y = 1/v_i$  dan  $x = 1/[S]$ .  $1/v_i$  sebagai fungsi  $y$  (absorbansi sampel) sebidang dengan  $1/[S]$  sebagai fungsi dari  $x$  (jumlah substrat) sehingga memberikan garis lurus yang memotong sumbu  $y$  adalah  $1/V_{\max}$  dan dengan kecuraman  $K_m/V_{\max}$ . Plot seperti itu disebut Plot resiprokal-ganda atau Lineweaver-Burk (Gambar 2.4).



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

**Gambar 2.4.** Plot Resiprokal-Ganda atau Lineweaver-Burk digunakan untuk mengevaluasi Nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$

Sehingga  $y = 0$ ;  $x = -1/K_m$ ;  $y = a + bx$

$$0 = a + b(-1/K_m) ; K_m = b/a \quad (2.5)$$

### 2.5.2 Penghambatan Aktivitas Enzim

Hambatan atau inhibisi pada suatu reaksi yang menggunakan enzim sebagai katalis dapat terjadi apabila penggabungan substrat pada bagian aktif enzim mengalami hambatan. Senyawa yang dapat menghambat reaksi tersebut dinamakan inhibitor. Penghambatan yang dilakukan oleh inhibitor tersebut dapat berupa penghambatan *irreversible* atau penghambatan *reversible*. Penghambatan *irreversible* pada umumnya disebabkan oleh terjadinya proses destruksi atau modifikasi sebuah gugus fungsi atau lebih yang terdapat pada molekul enzim, contohnya terbentuknya ikatan kovalen antara enzim dengan inhibitor. Penghambatan *reversible* dapat berupa penghambatan kompetitif dan penghambatan nonkompetitif. Cara membedakan penghambatan kompetitif dengan penghambatan nonkompetitif adalah berdasarkan pada apakah peningkatan konsentrasi substrat akan mengatasi inhibisi atau tidak dan berdasarkan plot timbal-balik ganda / *double reciprocal plot* (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).

#### 2.5.2.1 Inhibisi Kompetitif

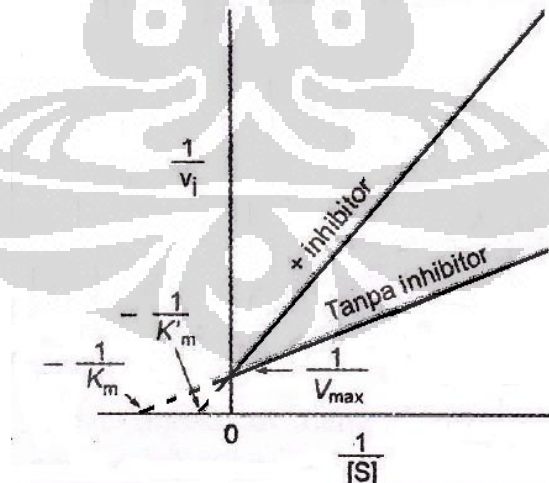
Efek inhibitor kompetitif dapat diatasi dengan meningkatkan konsentrasi substrat. Inhibisi kompetitif klasik terjadi pada tempat aktif ikatan substrat (katalitik). Pada umumnya, struktur kimia sebuah inhibitor (I) menyerupai struktur kimia substrat (S) atau biasa disebut analog substrat. Inhibitor (I) dapat berikatan secara *reversible* dengan enzim (E) sehingga yang seharusnya membentuk kompleks Enzim-Substrat (ES), justru membentuk kompleks Enzim-

Inhibitor (EI). Dengan demikian terjadi persaingan antara inhibitor dengan substrat untuk berikatan dengan bagian aktif enzim melalui reaksi sebagai berikut:



Penghambatan kompetitif menghalangi terbentuknya kompleks ES dengan cara membentuk kompleks EI (Poedjiadi, 1994). Berbeda dengan kompleks ES, kompleks EI ini tidak dapat membentuk produk/hasil reaksi (P). Suatu inhibitor kompetitif dan substrat menimbulkan efek timbal-balik pada konsentrasi kompleks EI dan ES. Karena terikatnya substrat pada enzim mengurangi enzim bebas yang tersedia untuk mengikat inhibitor, peningkatan [S] menurunkan konsentrasi kompleks EI dan meningkatkan kecepatan reaksi.

Untuk inhibisi kompetitif klasik, garis yang menghubungkan titik data eksperimen bertemu di sumbu y (Gambar 2.5). Karena perpotongan sumbu y =  $1/V_{max}$ , pola ini menunjukkan bahwa ketika  $1/[S] = 0$ ,  $v_i$  akan sama seperti pada keadaan tanpa penghambat (ekstrak). Inhibitor kompetitif tidak berefek pada  $V_{max}$ , tetapi meningkatkan  $K_m$ .



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

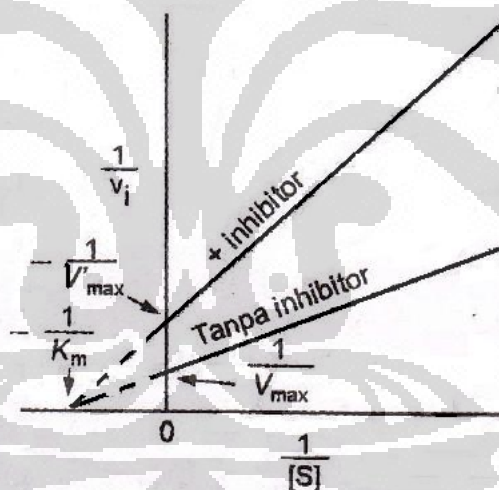
**Gambar 2.5.** Plot Lineweaver-Burk dari Inhibisi Kompetitif

### 2.5.2.2 Inhibisi Non Kompetitif

Tidak terdapat persaingan antara penghambat (ekstrak) dengan substrat. Penghambatan nonkompetitif terjadi ketika inhibitor berikatan dengan suatu bagian enzim di luar bagian aktif / di bagian yang berbeda dengan bagian pengikat substrat dan umumnya tidak atau sedikit memiliki kesamaan struktural dengan substrat. Penggabungan antara inhibitor dengan enzim dapat terjadi pada enzim bebas (E) atau pada enzim yang telah mengikat substrat/ kompleks enzim-substrat (ES).



Untuk inhibisi non kompetitif sederhana, enzim (E) dan enzim-inhibitor (EI) memiliki afinitas yang sama terhadap substrat (S), dan kompleks enzim-inhibitor-substrat (EIS) menghasilkan produk pada kecepatan yang hampir dapat diabaikan (Gambar 2.6).

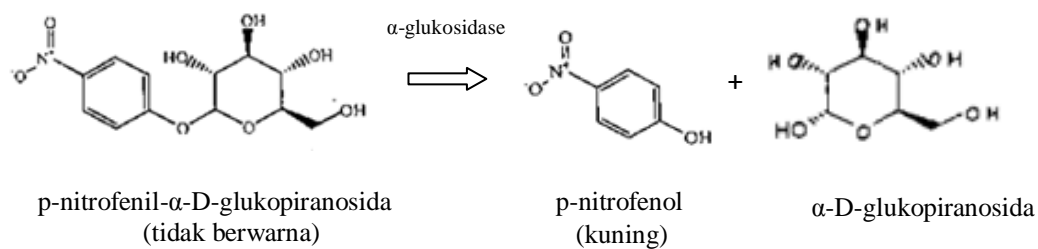


[Sumber : Murray, Granner, & Rodwell, 2009]

**Gambar 2.6.** Plot Lineweaver-Burk untuk Inhibisi Non Kompetitif

## 2.6 Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase

Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dilakukan secara *in vitro* dengan reaksi enzimatik dan pengukuran secara spektrofotometri. Metode yang digunakan adalah *Spectrophotometric Stop Rate Determination*.  $\alpha$ -Glukosidase akan mengkatalisis hidrolisis p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida menjadi p-nitrofenol (berwarna kuning) dan glukosa dengan mekanisme reaksi sebagai berikut :



[Sumber :Sugiwati, Setiasih, & Afifah, 2009]

**Gambar 2.7.** Reaksi Enzimatis  $\alpha$ -glukosidase & p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida

Aktivitas enzim diukur berdasarkan hasil pengukuran absorbansi p-nitrofenol (berwarna kuning). Intensitas warna kuning yang terbentuk ditentukan absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer *double beam* pada panjang gelombang 400 nm. Apabila ekstrak tanaman memiliki kemampuan menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase maka p-nitrofenol yang dihasilkan akan berkurang.

## 2.7 Penentuan Kinetika Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase

Penentuan kinetika penghambatan enzim diukur dengan meningkatkan konsentrasi p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida sebagai substrat, baik dengan maupun tanpa adanya penghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase (ekstrak) pada beberapa konsentrasi yang berbeda. Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten (Dewi, *et al.*, 2007).

Metode Lineweaver-Burk membedakan antara inhibisi kompetitif dan non kompetitif berdasarkan pada apakah peningkatan konsentrasi substrat akan mengatasi inhibisi atau tidak. Kinetika inhibisi enzim ditentukan dengan meningkatnya konsentrasi substrat baik dengan atau tanpa adanya penghambat (ekstrak).

## 2.8 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri adalah salah satu cabang analisis instrumental yang mempelajari interaksi antara atom/ molekul dengan radiasi elektromagnetik (REM). Interaksi tersebut dapat berupa hamburan (*scattering*), absorpsi

(*absorption*), emisi (*emission*). Interaksi antara radiasi elektromagnetik dengan atom/ molekul yang berupa absorpsi menghasilkan spektrofotometri absorpsi antara lain : spektrofotometri ultra violet (UV), spektrofotometri sinar tampak (VIS), spektrofotometri infra merah (IR).

Spektrofotometer yang sesuai untuk pengukuran di daerah spektrum ultraviolet dan sinar tampak terdiri atas suatu sistem optik dengan kemampuan menghasilkan sinar monokromatis dalam jangkauan panjang gelombang 200-800nm (Depkes RI, 1979a). Spektrofotometer UV-Vis dapat digunakan baik untuk analisa kualitatif maupun analisa kuantitatif. Spektrofotometri ultra violet yang dipakai untuk aplikasi kuantitatif menggunakan radiasi dengan panjang gelombang 200-380 nm, sedangkan spektrofotometri sinar tampak menggunakan radiasi dengan panjang gelombang 380-780 nm. Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Alasan mengapa harus menggunakan panjang gelombang maksimum yaitu pada panjang gelombang maksimum kepekaan/keakuratannya juga maksimum, daya serap relatif konstan dan bentuk kurva absorbansi cenderung datar. Pada bentuk kurva absorbansi yang cenderung datar/landai, kesalahan penempatan/pembacaan panjang gelombang dapat diabaikan.

Molekul yang dapat memberikan absorpsi yang bermakna pada daerah panjang gelombang 200-780 nm adalah molekul-molekul yang mempunyai gugus kromofor dan gugus aoksokrom. Gugus kromofor adalah gugus fungsi yang mempunyai spektrum absorpsi karakteristik pada daerah ultra violet atau sinar tampak. Gugus ini mengandung ikatan kovalen tidak jenuh (rangkap dua atau tiga), contohnya: ikatan C=C, C=C, C=O, N=O, N=N. Gugus aoksokrom adalah gugus yang dapat meningkatkan absorpsi dari suatu molekul. Gugus ini tidak memberikan absorpsi yang bermakna pada daerah ultra violet, tetapi dapat memberikan pengaruh yang besar pada absorpsi molekul di mana gugus tersebut terikat. Contoh dari gugus aoksokrom adalah OH, NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>.

Jika radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang antara 200-380 nm dikenakan pada molekul-molekul yang mempunyai gugus-gugus tersebut maka akan terjadi absorpsi dari radiasi elektromagnetik itu oleh molekul-molekul tadi dan mengakibatkan terjadinya transisi elektron dari tingkat energi yang lebih



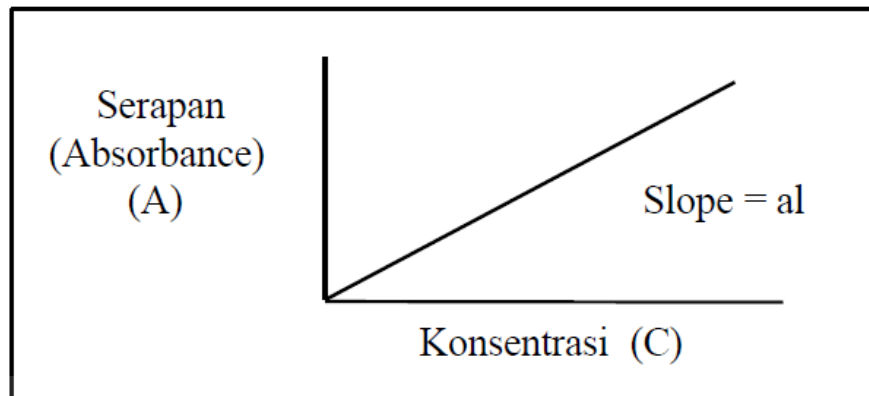
rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi (*eksitasi*). Apabila radiasi ultra violet atau sinar tampak dikenakan pada suatu medium yang homogen, maka sebagian dari sinar datang akan direfleksikan, sebagian akan diabsorpsi dan sisanya akan ditransmisikan. Jika intensitas sinar datang dinyatakan sebagai  $I_0$ , intensitas sinar yang direfleksikan sebagai  $I_r$ , intensitas sinar yang diabsorpsi sebagai  $I_a$ , dan intensitas sinar yang ditransmisikan sebagai  $I_t$ , maka  $I_0 = I_r + I_a + I_t$ . Pada spektrofotometri UV-VIS untuk antar permukaan gelas-udara (*air-glass interfaces*)  $I_r$  dapat dieliminasi dengan menggunakan kontrol/blanko, yaitu sel pembanding, sehingga  $I_0 = I_a + I_t$  (Kok, 1997).

### 2.8.1 Hukum Lambert-Beer

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = a \cdot C \cdot l \quad (2.6)$$

Keterangan : A = serapan (*absorbance*),  $I_0$  = intensitas sinar datang,  $I_t$  = intensitas sinar yang ditransmisikan, a = konstanta/koeffisien absorpsi, C = konsentrasi substansi penyerap, dan l = ketebalan medium / panjang lintasan yang dilalui oleh sinar.

Hukum Lambert-Beer dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi dari suatu substansi penyerap yang terdapat dalam suatu cuplikan (*sample*), jika koefisien absorpsi dari substansi penyerap dan ketebalan medium yang digunakan untuk wadah cuplikan diketahui; atau dapat juga dengan cara dibuat grafik antara beberapa konsentrasi substansi penyerap terhadap serapannya. Grafik ini akan merupakan suatu garis lurus/garis regresi (Gambar 2.7). Konsentrasi substansi penyerap dapat dibaca dari grafik tersebut atau dapat juga dihitung berdasarkan persamaan garisnya (persamaan regresi) setelah dilakukan pengukuran terhadap serapan (*absorbance*) dari substansi penyerap tersebut.

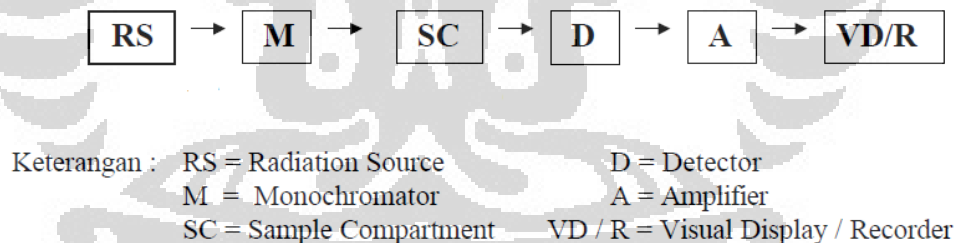


[Sumber : Kok, 1997]

**Gambar 2.8.** Hubungan Konsentrasi Substansi Penyerap dengan Serapan

### 2.8.2 Instrumentasi Spektrofotometer UV-VIS

Spektrofotometer pada dasarnya terdiri atas sumber sinar monokromator, tempat sel untuk zat yang diperiksa, detektor, penguat arus dan alat ukur/pencatat (Depkes RI, 1979a). Secara garis besar konfigurasi dari suatu spektrofotometer UV-VIS adalah sebagai berikut :



[Sumber : Kok, 1997]

**Gambar 2.9.** Instrumentasi Spektrofotometer UV-VIS

#### 2.8.2.1 Sumber Radiasi (*Radiation Source*)

Sumber radiasi berguna untuk memberikan radiasi dengan rentang panjang gelombang tertentu. Untuk daerah ultraviolet umumnya digunakan lampu hidrogen atau lampu deuterium, sedangkan untuk daerah sinar tampak umumnya digunakan lampu tungsten.

#### **2.8.2.2 Monokromator (*Monochromator*)**

Monokromator berfungsi untuk mengubah radiasi polikromatis yang dipancarkan oleh sumber radiasi menjadi radiasi monokromatis. Monokromator ini umumnya terdiri dari celah masuk (*entrance slit*), filter optik, prisma(*prism*) dan kisi (*grating*), dan celah keluar (*exit slit*). Celah masuk berfungsi untuk masuknya cahaya yang berasal dari sumber radiasi, filter optik berguna untuk menyerap warna komplementer agar sinar tampak yang diteruskan merupakan sinar yang warnanya sesuai dengan warna filter optik yang dipakai, prisma dan kisi berfungsi untuk mendispersi radiasi supaya didapatkan resolusi yang baik dari radiasi tersebut, celah keluar berfungsi untuk keluarnya cahaya dari monokromator menuju tempat cuplikan (*sample compartment*).

#### **2.8.2.3 Tempat Cuplikan (*Sample Compartment*)**

Tempat cuplikan berfungsi untuk meletakkan wadah cuplikan (sel/kuvet). Jadi cuplikan dimasukkan ke dalam sel/kuvet dan kuvet ini diletakkan pada *sample compartment* untuk diukur kadarnya. Ada dua macam bahan yang digunakan untuk membuat sel/kuvet, yaitu kuarsa dan gelas. Kuvet dari kuarsa dapat digunakan untuk pengukuran pada daerah ultraviolet dan sinar tampak, sedangkan kuvet dari gelas hanya dapat digunakan untuk pengukuran pada daerah sinar tampak karena gelas mengabsorpsi radiasi ultraviolet secara bermakna.

#### **2.8.2.4 Detektor (*Detector*)**

Detektor berfungsi untuk mengubah signal radiasi yang diterima menjadi signal elektronik.

#### **2.8.2.5 Penguat (*Amplifier*)**

Amplifier berfungsi untuk menguatkan signal elektronik yang ditransfer oleh detektor.

#### **2.8.2.6 Layar Visual (*Visual Display*) / Pencatat (*Recorder*)**

Visual Display atau Recorder berfungsi untuk menampilkan hasil pengamatan.

## **2.9 Pola Kromatogram, Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi yang Aktif**

### **2.9.1 Pola Kromatogram**

Prinsip pola kromatogram: ekstrak ditimbang, diekstraksi dengan pelarut dan cara tertentu, kemudian dilakukan analisis kromatografi sehingga memberikan pola kromatografi yang khas. Tujuannya adalah untuk memberikan gambaran awal komposisi kandungan kimia berdasarkan pola kromatogram (KLT, KCKT, KG). Penilaiannya adalah dengan membandingkan kesamaan pola dengan data baku yang ditetapkan terlebih dahulu (Depkes RI, 2000). Pada penelitian ini dilakukan Kromatografi Lapis Tipis untuk diperoleh pola kromatogramnya.

### **2.9.2 Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi adalah cara pemisahan zat berkhasiat dan zat lain yang ada dalam sediaan, dengan jalan penyarian berfraksi, atau penyerapan, atau penukaran ion pada zat berpori, menggunakan cairan atau gas yang mengalir (Depkes RI, 1979b). Zat yang diperoleh dapat digunakan untuk percobaan identifikasi atau penetapan kadar. Kromatografi yang sering digunakan adalah kromatografi kolom, kromatografi kertas, kromatografi lapisan tipis, dan kromatografi gas. Metode kromatografi yang digunakan pada penelitian ini adalah kromatografi lapisan tipis yang umum digunakan untuk memperoleh profil kromatogram dan identifikasi karena metode ini khas dan mudah dilakukan untuk zat dengan jumlah sedikit (Depkes RI, 1995).

Kromatografi lapisan tipis (KLT) digunakan pada pemisahan zat secara cepat, dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca. Lempeng yang dilapis dapat dianggap sebagai kolom kromatografi terbuka dan pemisahan didasarkan pada penyerapan, pembagian atau gabungannya, tergantung dari jenis zat penyerap dan cara pembuatan lapisan zat penyerap dan jenis pelarut. Adapun beberapa contoh zat

penyerap yang digunakan untuk pemisahan dalam kromatografi lapisan tipis adalah sebagai berikut:

**Tabel 2.3.** Zat Penyerap untuk Kromatografi Lapisan Tipis

No.	Zat Padat	Digunakan untuk Pemisahan
1.	Silika	Asam amino, alkaloid, gula, asam lemak, lipid, minyak esensial, sterol, terpenoid.
2.	Alumina	Alkaloid, fenol, steroid, vitamin, karoten, asam amino.
3.	Kieselguhr	Gula, oligosakarida, asam lemak, , asam amino, steroid
4.	Bubuk selulosa	Asam amino, alkaloid, nukleotida.
5.	Pati	Asam amino.
6.	Sephadex	Asam amino, protein.

[Sumber : Sastrohamidjojo, 1985]

Bila dibandingkan dengan kromatografi kertas, metode kromatografi lapisan tipis memiliki kelebihan utama, yaitu menghasilkan pemisahan yang lebih baik dan hanya membutuhkan waktu yang singkat (Sastrohamidjojo, 1985). Pada metode kromatografi lapis tipis, perlu dibuat kromatogram dari zat pembanding kimia di samping kromatogram dari zat yang diperiksa (dilakukan pada lempeng yang sama). Perkiraan identifikasi diperoleh dengan pengamatan 2 bercak dengan harga Rf dan ukuran yang lebih kurang sama (Depkes RI, 1995). Adapun perhitungan harga Rf adalah :

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh zat}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh eluen}} \quad (2.7)$$

### 2.9.3 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia adalah pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan. Pemeriksaan diarahkan pada senyawa metabolit sekunder yang memiliki khasiat bagi kesehatan seperti, alkaloid, flavonoid, terpen, tanin, saponin, glikosida, kuinon dan antrakuinon (Harborne, 1987).

### 2.9.3.1 Alkaloid

Alkaloid adalah golongan senyawa yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam gabungan berbentuk siklik, serta dapat dideteksi dengan cara pengendapan menggunakan pereaksi Mayer, Dragendorf, dan Bouchardat. Alkaloid sebagian besar berbentuk kristal padat dan sebagian kecil berupa cairan pada suhu kamar, memutar bidang polarisasi dan terasa pahit (Harborne, 1987).

### 2.9.3.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa yang umumnya terdapat pada tumbuhan berpembuluh. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai glikosida dan aglikon flavonoid. Biasanya dalam menganalisis flavonoid, yang diperiksa ialah aglikon dalam ekstrak tumbuhan yang sudah dihidrolisis.

Proses ekstraksi flavonoid dilakukan dengan etanol mendidih untuk menghindari oksidasi enzim (Harborne, 1987). Pendeteksian adanya senyawa ini dapat dilakukan dengan menambahkan larutan besi (III) klorida 1% dalam air atau etanol yang menimbulkan warna hijau atau hitam kuat.

### 2.9.3.3 Terpen

Terpen adalah suatu senyawa yang tersusun dari isopren  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$  dan memiliki kerangka karbon yang dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan unit isopren ini.

Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa seperti monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap, diterpen yang sukar menguap dan yang tidak menguap, triterpen, dan sterol.

Secara umum terpen larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya terpen diekstraksi dengan menggunakan eter dan kloroform. Saponin dan glikosida jantung merupakan golongan senyawa triterpen atau steroid yang terdapat dalam bentuk glikosida (Harborne, 1987). Senyawa ini biasanya diidentifikasi dengan reaksi Liebermann-Bouchardat (anhidrat asetat- $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) yang memberikan warna hijau kehitaman sampai biru.

### **2.9.3.4 Tanin**

Tanin merupakan senyawa yang umum terdapat dalam tumbuhan berpembuluh, memiliki gugus fenol, rasa sepat dan mampu menyamak kulit karena kemampuannya menyambung-silang protein. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tak larut dalam air.

Secara kimia, tanin dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Tanin terhidrolisis mengandung ikatan ester yang terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer (Harborne, 1987). Tanin diidentifikasi dengan cara pengendapan menggunakan larutan gelatin 10%, campuran natrium klorida-gelatin, besi (III) klorida 3%, dan timbal (II) asetat 25%.

### **2.9.3.5 Saponin**

Saponin adalah glikosida triterpen yang merupakan senyawa aktif permukaan dan dapat menimbulkan busa jika dikocok dengan air. Pada konsentrasi yang rendah dapat menyebabkan hemolisis sel darah merah pada tikus (Harborne, 1987). Identifikasi saponin dapat dilakukan dengan mengocok ekstrak bersama air hangat di dalam tabung reaksi dan akan timbul busa yang dapat bertahan lama, setelah penambahan HCl 2N busa tidak hilang.

### **2.9.3.6 Glikosida**

Glikosida merupakan suatu senyawa yang bila dihidrolisis akan terurai menjadi gula (glikon) dan senyawa lain (aglikon atau genin). Pada umumnya glikon berupa glukosa, fruktosa, laktosa, galaktosa dan manosa. Dapat pula berupa gula khusus seperti sarmentosa, oleandrosa, simarosa dan rutinosa. Sedangkan aglikon (genin) biasanya mempunyai gugus -OH dalam bentuk alkoholis atau fenolis. Glikosida dapat dibedakan menjadi  $\alpha$ -glikosida dan  $\beta$ -glikosida. Pada tanaman, glikosida biasanya terdapat dalam bentuk  $\beta$ -glikosida. Kegunaan glikosida bagi tanaman adalah untuk cadangan gula sementara,

sedangkan bagi manusia umumnya digunakan untuk obat jantung, diuretika, dan prekursor hormon steroid.

### **2.9.3.7 Kuinon dan Antrakuinon**

Kuinon merupakan senyawa berwarna dan memiliki kromofor dasar. Untuk tujuan identifikasi, kuinon dibagi menjadi empat kelompok, diantaranya adalah benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon dan isoprenoid. Kelompok benzokuinon, naftokuinon dan antrakuinon diperlukan hidrolisis asam untuk melepas kuinon bebasnya. Sedangkan kuinon isoprenoid yang terlibat dalam respirasi sel dan fotosintesis diperlukan cara khusus untuk memisahkannya dari bahan lipid lain (Harborne, 1987).







## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Laboratorium Penelitian Fitokimia dan Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok, selama kurang lebih empat bulan, dari bulan Agustus hingga November 2011.

#### 3.2 Alat

Lemari pengering, alat/batu penumbuk, ayakan, oven (Hotpack vacum oven), timbangan analitik (AND HR-200), blender (Waring, USA), *rotary evaporator* (Janke & Kunkel IKA, Jerman), pH meter (Eutech Instruments), *shaker*, penangas air, spektrofotometer UV-Vis (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instrument Ltd), kuvet kuarsa, pipet mikro (Thermo Scientific), alkoholmeter, *freeze dry* (Scanvac), *magnetic stirrer* (Yellow line MAG HS7), inkubator (Heidolph 2000), *vortex mixer* (Health H-VM-300), lempeng silika gel F254, kolom kromatografi, dan alat-alat gelas lainnya. Beberapa alat yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 3.1–3.8.

#### 3.3 Bahan

##### 3.3.1 Bahan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah beserta biji ketapang (*Terminalia catappa* L.) yang diperoleh dari sekitar lingkungan Universitas Indonesia pada bulan Juli dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense (LIPI), Cibinong.

##### 3.3.2 Bahan Kimia

Enzim  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* recombinant (Sigma Aldrich, USA), substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Jepang), dimetil sulfoksida

(DMSO) (Merck, Jerman), *bovine serum albumin* (BSA) (Merck, Jerman), akarbose, natrium karbonat (Merck, Jerman), dikalium hidrogenfosfat (Merck, Jerman), kalium dihidrogenfosfat (Merck, Jerman), etanol, petroleum eter, etil asetat, butanol, metanol, akuades, air bebas CO<sub>2</sub>, asam klorida (Merck, Jerman), iodium (Merck, Jerman), kalium iodida (Merck, Jerman), raksa (II) klorida (Merck, Jerman), bismut (III) nitrat (Merck, Jerman), asam nitrat (Merck, Jerman), timbal (II) asetat, natrium sulfat anhidrat (Merck, Jerman), asam asetat anhidrat (Univar, USA), asam sulfat (Merck, Jerman),  $\alpha$ -naftol, serbuk zink (Merck, Jerman), serbuk magnesium (Merck, Jerman), aseton, serbuk asam borat (Merck, Jerman), serbuk asam oksalat (Merck, Jerman), eter, besi (II) klorida, natrium klorida (Mallinckrodt Chemicals, USA), gelatin (Merck, Jerman), natrium hidroksida (Univar, USA), kuersetin (Merck, Jerman), aluminium (III) klorida.

### **3.4 Prosedur Pelaksanaan**

#### **3.4.1 Penyiapan Larutan Pereaksi**

##### **3.4.1.1 Larutan Pereaksi Bouchardat**

Larutan pereaksi Bouchardat dibuat dari campuran iodium dan kalium iodida. Sebanyak 2 g iodium P dan 4 g kalium iodida P dilarutkan dengan akuades secukupnya hingga 100,0 mL.

##### **3.4.1.2 Larutan raksa (II) klorida**

Larutan raksa (II) klorida dibuat dengan cara melarutkan 1,358 g raksa (II) klorida dengan akuades secukupnya hingga 60,0 mL.

##### **3.4.1.3 Larutan kalium iodida**

Larutan kalium iodida dibuat dengan cara melarutkan 5 g kalium iodida P dengan akuades secukupnya hingga 10,0 mL.

##### **3.4.1.4 Larutan Pereaksi Mayer**

Larutan Pereaksi Mayer dibuat dengan cara mencampurkan larutan raksa (II) klorida dengan larutan kalium iodida. Kedua larutan tersebut dicampurkan dan dicukupkan volumenya dengan akuades hingga 100,0 mL.

#### **3.4.1.5 Larutan Asam Nitrat 0,5 N**

Larutan asam nitrat 0,5 N dibuat dengan cara melarutkan 3,15 g asam nitrat dengan akuades hingga 100,0 mL.

#### **3.4.1.6 Larutan bismuth nitrat**

Larutan bismuth nitrat dibuat dengan cara melarutkan 8 g bismuth nitrat dengan asam nitrat 0,5 N hingga 20,0 mL.

#### **3.4.1.7 Larutan kalium iodida**

Larutan kalium iodida dibuat dengan cara melarutkan 27,2 g kalium iodida dengan akuades hingga 50,0 mL.

#### **3.4.1.8 Larutan Pereaksi Dragendorf**

Larutan Pereaksi Dragendorf dibuat dari campuran larutan bismuth nitrat dalam asam nitrat dan larutan kalium iodida. Kedua larutan dicampur dan didiamkan hingga memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan dicukupkan dengan akuades hingga 100,0 mL.

#### **3.4.1.9 Larutan Pereaksi Mollisch**

Larutan Pereaksi Mollisch dibuat dengan cara melarutkan 1,50 g  $\alpha$ -naftol P dalam 50 mL asam nitrat 0,5 N.

#### **3.4.1.10 Larutan Asam Klorida 2 N**

Larutan asam klorida 2 N dibuat dengan cara melarutkan 7,3 g asam klorida dengan akuades secukupnya hingga 100,0 mL.

#### **3.4.1.11 Larutan Ferri (III) Klorida 1%**

Larutan ferri (III) klorida 1% dibuat dengan cara melarutkan 1,62 g ferri (III) klorida dengan akuades secukupnya hingga 100,0 mL.

#### **3.4.1.12 Etanol 70 %**

Etanol 70% dibuat dengan cara mengencerkan sejumlah 737 mL etanol 95% P dengan akuades sedikit demi sedikit, disertai pengecekan menggunakan alkoholmeter setiap kali penambahan akuades. Penambahan akuades ini dilakukan terus-menerus hingga batas alkoholmeter menunjukkan angka 70.

#### **3.4.1.13 Etanol 80%**

Etanol 80% dibuat dengan cara mengencerkan 842 mL etanol 95% P dengan akuades sedikit demi sedikit, disertai pengecekan menggunakan alkoholmeter setiap kali penambahan akuades. Penambahan akuades ini dilakukan terus-menerus hingga batas alkoholmeter menunjukkan angka 80.

#### **3.4.1.14 Larutan Timbal (II) Asetat 0,4 M**

Larutan timbal (II) asetat 0,4 M dibuat dengan cara melarutkan 18,976 g timbal (II) asetat dengan akuades secukupnya hingga 100,0 mL.

#### **3.4.1.15 Larutan Natrium Hidroksida 1 N**

Larutan natrium hidroksida 1 N dibuat dengan cara melarutkan 4 g natrium hidroksida dengan akuades secukupnya hingga 100,0 mL.

#### **3.4.1.16 Larutan Natrium Hidroksida 2 N**

Larutan natrium hidroksida 2 N dibuat dengan cara melarutkan 8 g natrium hidroksida dengan akuades secukupnya hingga 100,0 mL.

#### **3.4.1.17 Natrium hidroksida 0,1 N**

Larutan natrium hidroksida 0,1 N dibuat dengan melarutkan 4,0 g natrium hidroksida dengan akuades secukupnya hingga 1000,0 mL.

#### **3.4.1.18 Kalium Dihidrogenfosfat 0,1 M**

Larutan kalium dihidrogenfosfat 0,1 M dibuat dengan melarutkan 13,609 g kalium dihidrogenfosfat dengan air bebas CO<sub>2</sub> secukupnya hingga 1000,0 mL.

#### **3.4.1.19 Larutan Dapar Fosfat pH 6,8**

Larutan dapar fosfat pH 6,8 dibuat dengan mencampurkan 50,0 mL Kalium dihidrogenfosfat 0,1 M dengan sedikit demi sedikit (hingga kurang lebih 22,4 mL) natrium hidroksida 0,1 N, disertai pengecekan menggunakan pH meter setiap kali penambahan natrium hidroksida 0,1 N. Campuran tersebut kemudian ditambahkan dengan air bebas CO<sub>2</sub> secukupnya hingga 200,0 mL.

#### **3.4.1.20 Larutan Dapar Fosfat pH 7,0**

Larutan dapar fosfat pH 7,0 dibuat dengan mencampurkan 50,0 mL Kalium dihidrogenfosfat 0,1 M dengan sedikit demi sedikit (hingga kurang lebih 29,1 mL) natrium hidroksida 0,1 N, disertai pengecekan menggunakan pH meter setiap kali penambahan natrium hidroksida 0,1 N. Campuran tersebut kemudian ditambahkan dengan air bebas CO<sub>2</sub> secukupnya hingga 200,0 mL.

#### **3.4.1.21 Larutan Dapar Fosfat pH 7,2**

Larutan dapar fosfat pH 7,2 dibuat dengan mencampurkan 50,0 mL Kalium dihidrogenfosfat 0,1 M dengan sedikit demi sedikit (hingga kurang lebih 34,7 mL) natrium hidroksida 0,1 N, disertai pengecekan menggunakan pH meter setiap kali penambahan natrium hidroksida 0,1 N. Campuran tersebut kemudian ditambahkan dengan air bebas CO<sub>2</sub> secukupnya hingga 200,0 mL.

#### **3.4.1.22 Larutan Bovin Serum Albumin (BSA)**

Masing-masing sejumlah 200 mg BSA dilarutkan dalam 100 mL dapar fosfat (pH 6,8 / 7,0 / 7,2).

#### **3.4.1.23 Larutan Enzim**

Masing-masing larutan enzim 0,5579 U/mL dibuat dengan cara melarutkan 1,20 mg  $\alpha$ -glukosidase larutan BSA secukupnya hingga 100,0 mL dalam kondisi dingin. Kemudian larutan induk enzim 0,5579 U/mL diencerkan dengan dapar fosfat (pH 6,8 / 7,0 / 7,2) hingga diperoleh larutan enzim 0,0279 U/mL. Cara perhitungan unit larutan  $\alpha$ -glukosidase dapat dilihat pada Lampiran 5.

#### **3.4.1.24 Larutan Substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida 30 mM; 20 mM; 15mM; 10 mM; 5 mM; 2,5 mM; 1,25 mM; 0,625 mM**

Larutan substrat 30 mM dibuat dengan cara melarutkan 90,375 mg p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dalam 100 mL akuades. Larutan substrat dapat diencerkan dengan akuades hingga diperoleh larutan substrat 20 mM; 15mM; 10 mM; 5 mM; 2,5 mM; 1,25 mM; dan 0,625 mM. Larutan substrat untuk pengujian harus segar, harus segera digunakan setelah dibuat dan tidak bisa disimpan.

#### **3.4.1.25 Larutan Natrium Karbonat 200 mM**

Larutan natrium karbonat 200 mM dibuat dengan cara melarutkan 21,2 g natrium karbonat dengan akuades secukupnya hingga 1000,0 mL.

#### **3.4.1.26 Larutan Standar / Pembanding**

Akarbose ditimbang seksama sebanyak 100,0 mg dan dilarutkan dalam dapar fosfat pH optimum hingga diperoleh konsentrasi larutan standar 1%. Larutan standar 1% diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar 0,5%; 0,25%; dan 0,125%.

#### **3.4.1.27 Larutan Sampel**

Ekstrak ditimbang seksama sebanyak 100,0 mg dan dilarutkan dalam 2-10mL dimetil sulfoksida kemudian dicukupkan volumenya hingga batas pada labu ukur dengan dapar fosfat pH optimum hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 1%. Larutan ekstrak 1% diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 0,5%, 0,25% dan 0,125 %.

### **3.4.2 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap seperti diperlihatkan pada diagram alir penelitian (Lampiran 1) yang terdiri dari: tahap pertama penyiapan simplisia, kedua ekstraksi simplisia, ketiga fraksinasi, keempat optimasi aktivitas  $\alpha$ -glukosidase, kelima uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dari berbagai

fraksi, keenam uji kinetika penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dari fraksi aktif, dan ketujuh kromatografi serta identifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi aktif.

### **3.4.3 Prosedur Kerja**

#### **3.4.3.1 Penyiapan Simplisia Uji**

Buah (beserta biji) ketapang yang digunakan adalah buah yang tua tetapi belum matang / masih berwarna hijau, dan belum gugur pada bulan Juli 2011. Buah ketapang dikumpulkan, disortasi, dibersihkan dari pengotor dan dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Setelah selesai dicuci, buah ketapang ditiriskan pada temperatur kamar dan ditimbang berat buah segar. Buah tersebut kemudian diperkecil dengan cara ditumbuk, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka dan terlindung dari sinar matahari langsung selama waktu tertentu ( $\pm 7$  hari), karena kandungan air pada buah ketapang cukup banyak. Simplisia buah ketapang yang sudah cukup kering selanjutnya dimasukan ke dalam lemari pengering dan ditimbang berat buah kering guna menghitung persentase perbandingan berat buah kering terhadap berat buah segar (susut pengeringan). Simplisia yang telah kering disortasi kembali untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang tertinggal, kemudian dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan blender, diayak dengan ayakan 40 mesh dan disimpan dalam wadah.

#### **3.4.3.2 Ekstraksi**

Serbuk simplisia kering sebanyak 1,5 kg diekstraksi dengan cara dingin, yaitu maserasi dengan bantuan *shaker* selama enam jam menggunakan pelarut etanol 80% setinggi 3-5 cm diatas serbuk simplisia. Saring maserat pertama, kemudian remaserasi sebanyak lima kali, hingga dihasilkan ekstrak cair yang sudah tidak berwarna pekat. Kemudian seluruh ekstrak cair etanol diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C hingga etanol menguap seluruhnya. Selanjutnya ekstrak dikeringkan dengan menggunakan *freeze dry* (dengan sebelumnya dibekukan terlebih dahulu) untuk menghasilkan



ekstrak etanol kering (Lampiran 2). Ekstrak etanol kering yang diperoleh ditimbang untuk menghitung rendemen.

### 3.4.3.3 Fraksinasi

Ekstrak etanol kering difraksinasi menggunakan pelarut yang semakin meningkat kepolarannya berturut-turut dari pelarut nonpolar hingga pelarut polar yaitu petroleum eter, etil asetat, butanol dan metanol (Lampiran 3).

Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi menggunakan corong pisah. Namun sebelum difraksinasi, ekstrak etanol kering didispersikan dengan air panas terlebih dahulu, kemudian dipartisi dengan menambahkan petroleum eter dengan perbandingan 1:1, kocok kuat selama  $\pm 1$  jam, diamkan hingga terbentuk dua lapisan dengan ekstrak air yang berada di bagian bawah dan ekstrak / lapisan petroleum eter di bagian atas, selanjutnya pisahkan keduanya.

Ekstrak/fraksi petroleum eter diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak/fraksi petroleum eter kental, sedangkan ekstrak air selanjutnya difraksinasi kembali dengan cara yang sama menggunakan pelarut etil asetat dan butanol hingga diperoleh ekstrak/fraksi etil asetat kental, ekstrak/fraksi butanol kental dan ekstrak air. Ekstrak air kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga sedikit mengental, lalu ditambahkan metanol 100 mL dan dibiarkan menguap hingga diperoleh ekstrak/fraksi metanol-air kental. Kemudian ekstrak/fraksi petroleum eter, etil asetat, butanol dan metanol-air kental yang diperoleh ditimbang, dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C.

### 3.4.4 Optimasi Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase

Optimasi aktivitas  $\alpha$ -glukosidase perlu dilakukan terlebih dahulu sebelum uji penghambatan  $\alpha$ -glukosidase. Optimasi enzim bertujuan untuk mengetahui kondisi yang optimal agar enzim bekerja secara optimal. Uji aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dilakukan berdasarkan kondisi dimana aktivitas enzim paling baik. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa hasil yang diperoleh dari penghambatan aktivitas enzim merupakan kerja dari ekstrak yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim tersebut. Optimasi yang

dilakukan adalah optimasi konsentrasi substrat, pH dan waktu inkubasi dengan larutan enzim 0,0279 U/mL.

### 3.4.4.1 Prosedur (Dewi, *et al.*, 2007; Choudhary, *et.al.*, 2011)

#### a. Pengujian Aktivitas Larutan Enzim 0,0279 U/mL

Campuran reaksi terdiri dari 20  $\mu$ L dimetil sulfoksida (DMSO), 980  $\mu$ L 100 mM dapar fosfat (pH 7,0) dan 500  $\mu$ L 10 mM p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG), lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37° C. Untuk larutan uji, ditambahkan 500  $\mu$ L larutan enzim 0,0279 U/mL dan selanjutnya diinkubasi selama 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 2000  $\mu$ L 200 mM natrium karbonat. P-nitrofenol yang dihasilkan dibaca absorbansinya pada  $\lambda$  400 nm. Pada uji larutan kontrol, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim (Tabel 3.1).

**Tabel 3.1.** Pengujian Aktivitas Larutan Enzim 0,0279 U/mL

Reagen	Volume ( $\mu$ L)	
	Uji	Kontrol
DMSO	20	20
Dapar fosfat (pH 7,0)	980	980
Substrat (10 mM)	500	500
<b>Inkubasi penangas air 37°C, 5 menit</b>		
Enzim (0,0279 U/mL)	500	-
Natrium karbonat 200 mM	-	2000
<b>Inkubasi penangas air 37°C, 15 menit</b>		
Enzim (0,0279 U/mL)	-	500
Natrium karbonat 200 mM	2000	-
<b>Ukur absorbansi pada <math>\lambda = 400</math> nm</b>		

#### b. Penentuan Optimasi pH

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 20  $\mu$ L dimetil sulfoksida (DMSO), 980  $\mu$ L 100 mM dapar fosfat (pH 6,8; 7,0; 7,2) dan 500  $\mu$ L 10 mM p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG), lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu

37° C. Untuk larutan uji, ditambahkan 500 µL larutan enzim konsentrasi optimum dan selanjutnya diinkubasi selama 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 2000 µL 200 mM natrium karbonat. P-nitrofenol yang dihasilkan dibaca absorbansinya pada  $\lambda$  400 nm. Pada uji larutan kontrol, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim (Tabel 3.2).

**Tabel 3.2.** Prosedur Optimasi pH

Reagen	Volume (µL)					
	U <sub>1</sub>	K <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>	K <sub>2</sub>	U <sub>3</sub>	K <sub>3</sub>
DMSO	20	20	20	20	20	20
Dapar fosfat pH 6,8	980	980	-	-	-	-
Dapar fosfat pH 7,0	-	-	980	980	-	-
Dapar fosfat pH 7,2	-	-	-	-	980	980
Substrat (10 mM)	500	500	500	500	500	500
<b>Inkubasi penangas air 37°C, 5 menit</b>						
Enzim (konsentrasi optimum)	500	-	500	-	500	-
Natrium karbonat 200 Mm	-	2000	-	2000	-	2000
<b>Inkubasi penangas air 37°C, 15 menit</b>						
Enzim (konsentrasi optimum)	-	500	-	500	-	500
Natrium karbonat 200 mM	2000	-	2000	-	2000	-
<b>Ukur absorbansi pada <math>\lambda = 400</math> nm</b>						

Keterangan: U<sub>1</sub>= larutan uji dengan dapar fosfat pH (6,8), K<sub>1</sub>= larutan kontrol dengan dapar fosfat pH (6,8), U<sub>2</sub>= larutan uji dengan dapar fosfat pH (7,0), K<sub>2</sub>= larutan kontrol dengan dapar fosfat pH (7,0), U<sub>3</sub>= larutan uji dengan dapar fosfat pH (7,2), K<sub>3</sub>= larutan kontrol dengan dapar fosfat pH (7,2).

### c. Penentuan Optimasi Waktu Inkubasi

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 20 µL dimetil sulfoksida (DMSO), 980 µL 100 mM dapar fosfat dengan pH optimum dan 500 µL 10 mM p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG), lalu diinkubasi selama 5 menit pada

suhu 37° C. Untuk larutan uji, ditambahkan 500 µL larutan enzim dengan konsentrasi optimum dan selanjutnya diinkubasi selama masing-masing 15; 20; 30 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 2000 µL 200 mM natrium karbonat. P-nitrofenol yang dihasilkan dibaca absorbansinya pada  $\lambda$  400 nm. Pada uji larutan kontrol, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim (Tabel 3.3).

**Tabel 3.3.** Prosedur Optimasi Waktu Inkubasi

Reagen	Volume (µL)	
	Uji	Kontrol
DMSO	20	20
Dapar fosfat (pH optimum)	980	980
Substrat (10 mM)	500	500
<b>Inkubasi penangas air 37°C, 5 menit</b>		
Enzim (konsentrasi optimum)	500	-
Natrium karbonat 200 mM	-	2000
<b>Inkubasi penangas air 37°C, 15 menit / 20 menit / 30 menit</b>		
Enzim (konsentrasi optimum)	-	500
Natrium karbonat 200 mM	2000	-
<b>Ukur absorbansi pada <math>\lambda = 400</math> nm</b>		

#### **d. Penentuan Optimasi Konsentrasi Substrat**

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 20 µL dimetil sulfoksida (DMSO), 980 µL 100 mM dapar fosfat pH optimum dan 500 µL p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi masing-masing 30 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5mM, 2,5 mM, 1,25 mM, 0,625 mM, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37° C. Untuk larutan uji, ditambahkan 500 µL larutan enzim dengan konsentrasi optimum dan selanjutnya diinkubasi selama waktu optimum. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 2000 µL 200 mM natrium karbonat. P-nitrofenol yang dihasilkan dibaca absorbansinya pada  $\lambda$  400nm. Pada uji larutan

kontrol, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim (Tabel 3.4).

**Tabel 3.4.** Prosedur Optimasi Konsentrasi Substrat

Reagen	Volume (µL)	
	Uji	Kontrol
DMSO	20	20
Dapar fosfat (pH optimum)	980	980
Substrat (konsentrasi 30 mM / 20mM / 15 mM / 10 mM / 5 mM / 2,5 mM / 1,25 mM / 0,625 mM)	500	500
<b>Inkubasi penangas air 37°C, 5 menit</b>		
Enzim (konsentrasi optimum)	500	-
Natrium karbonat 200 mM	-	2000
<b>Inkubasi penangas air 37°C, (waktu optimum)</b>		
Enzim (konsentrasi optimum)	-	500
Natrium karbonat 200 mM	2000	-
<b>Ukur absorbansi pada <math>\lambda = 400 \text{ nm}</math></b>		

#### 3.4.4.2 Perhitungan Aktivitas Enzim (Kikkoman, 2001)

$$\text{Unit/mL enzim} = \frac{(A_{400\text{NM}} \text{ Uji} - A_{400\text{NM}} \text{ Blanko}) \times V \times df}{18,1 \times V_e \times t} \quad (3.1)$$

$$\text{Unit/mg enzim} = \text{Unit/mL enzim} \times \frac{1}{C} \quad (3.2)$$

**Keterangan :**

V = Volume total (mL)

df = faktor pengenceran

18.1 = Ekstinsi milimolar p-Nitrophenol pada 400 nm

$V_e$  = Volume enzim (mL)

t = Waktu inkubasi (menit)

C = Banyaknya  $\alpha$ -glukosidase dalam larutan (mg/mL)

**Definisi Unit:** (Kikkoman, 2011)

Satu unit akan melepaskan 1,0  $\mu\text{mol}$  D-glukosa dari p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukosida per menit pada pH 7,0 dan suhu  $37^\circ\text{C}$ .

### **3.4.5 Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase** (Dewi, *et al.*, 2007; Choudhary, *et.al.*, 2011)

Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dilakukan sesuai dengan kondisi optimasi yang diperoleh. Berikut ini ialah prosedur dalam menentukan penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase (Lampiran 4) :

#### **a. Pengujian Blanko**

Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  larutan dimetil sulfoksida ditambah dengan 980  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pH optimum dan 500  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimum, diinkubasi selama 5 menit pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Kemudian ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan enzim 0,0279 U/mL, dan diinkubasi kembali selama waktu optimum pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 2000  $\mu\text{L}$  200 mM natrium karbonat. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

#### **b. Pengujian Kontrol Blanko**

Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  larutan dimetil sulfoksida ditambah dengan 980  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pH optimum dan 500  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimum, diinkubasi selama 5 menit pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Kemudian ditambahkan 2000  $\mu\text{L}$  200 mM natrium karbonat. Dan diinkubasi kembali selama waktu optimum pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan enzim 0,0279 U/mL. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

### **c. Pengujian Sampel**

Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  larutan sampel (ekstrak) ditambah dengan 980  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pH optimum dan 500  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimum, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan enzim 0,0279 U/mL, kemudian diinkubasi kembali selama waktu optimum pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 2000  $\mu\text{L}$  200 mM natrium karbonat. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali. Hitung % inhibisi pada setiap konsentrasi ekstrak dan  $\text{IC}_{50}$  pada setiap ekstrak.

### **d. Pengujian Kontrol Sampel**

Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  larutan sampel (ekstrak) ditambah dengan 980  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pH optimum dan 500  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimum, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 2000  $\mu\text{L}$  200 mM natrium karbonat dan diinkubasi kembali selama waktu optimum pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan enzim 0,0279 U/mL. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

### **e. Pengujian Standar / Pemanding**

Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  larutan standar (akarbose) ditambah dengan 980  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pH optimum dan 500  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimum, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan enzim 0,0279 U/mL, kemudian diinkubasi kembali selama waktu optimum pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 2000  $\mu\text{L}$  200 mM natrium karbonat. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm. Pengujian

dilakukan sebanyak tiga kali. Hitung % inhibisi setiap konsentrasi akarbose dan IC<sub>50</sub> akarbose.

#### f. Pengujian Kontrol Standar / Pembanding

Sebanyak 20 µL larutan standar (akarbose) ditambah dengan 980 µL dapar fosfat pH optimum dan 500 µL p-nitrofenil-α-D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimum, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 2000 µL 200 mM natrium karbonat dan diinkubasi kembali selama waktu optimum pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 500µL larutan enzim 0,0279 U/mL. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

**Tabel 3.5.** Prosedur Uji Penghambatan Aktivitas α-Glukosidase

Reagen	Volume (µL)			
	B <sub>1</sub>	B <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>0</sub>
<b>Sampel / inhibitor</b>	-	-	20	20
<b>DMSO</b>	20	20	-	-
<b>Dapar fosfat (pH optimum)</b>	980	980	980	980
<b>Substrat (konsentrasi optimum)</b>	500	500	500	500
Inkubasi penangas air 37°C, 5 menit				
<b>Enzim 0,0279 U/mL</b>	500	-	500	-
<b>Natrium karbonat</b>	-	2000	-	2000
Inkubasi penangas air 37°C, waktu optimum				
<b>Enzim 0,0279 U/mL</b>	-	500	-	500
<b>Natrium karbonat</b>	2000	-	2000	-
Ukur absorbansi pada λ = 400 nm				

Keterangan : B<sub>1</sub>= Blanko, B<sub>0</sub>= Kontrol Blanko, S<sub>1</sub>= Sampel dan Standar (akarbose), S<sub>0</sub>= Kontrol Sampel dan Kontrol Standar (akarbose)



Aktivitas inhibitor  $\alpha$ -glukosidase dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{C-S}{C} \times 100\% \quad (3.3)$$

Keterangan: S = absorbansi sampel ( $S_1-S_0$ )

C = absorbansi kontrol (DMSO), ( $B_1-B_0$ )

$IC_{50}$  dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Dari persamaan:  $y = a + bx$  dapat dihitung nilai  $IC_{50}$  dengan menggunakan rumus :

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b} \quad (3.4)$$

#### 3.4.6 Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase (Dewi, *et al.*, 2007; Choudhary, *et.al.*, 2011)

Uji kinetika penghambatan aktivitas enzim diukur dengan meningkatkan konsentrasi p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida sebagai substrat (Tabel 3.6). Ekstrak yang akan digunakan sebagai penghambat aktivitas enzim merupakan fraksi aktif yang memiliki penghambatan aktivitas enzim tertinggi pada uji penghambatan aktivitas enzim.

Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten (Dewi, *et al.*, 2007). Tetapan kinetika Michaelis-Menten dihitung berdasarkan persamaan regresi  $y = a + b x$ , dimana x adalah  $1/[S]$  dan y adalah  $1/A$ . Jenis inhibisi dapat juga dilihat dari bentuk plot Lineweaver-Burk (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).

**Tabel 3.6.** Prosedur Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim

Reagen	Volume ( $\mu$ L)	
	Tanpa Inhibitor	Dengan Inhibitor
Ekstrak	-	20
DMSO	20	-
Dapar fosfat (pH optimum)	980	980
Substrat (konsentrasi optimum)	500	500

Inkubasi penangas air 37°C selama 5 menit		
Enzim 0,0279 U/mL	500	500
Inkubasi penangas air 37°C selama waktu optimum		
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2000	2000
Ukur absorbansi pada $\lambda = 400$ nm		

### 3.4.7 Pola Kromatogram dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi Aktif

Masing-masing fraksi aktif dibuat sebagai larutan uji dengan melarutkannya dengan pelarut pembawa, kemudian dianalisis dengan kromatografi lapis tipis. Umumnya dibuat kromatogram pada lempeng silika gel dengan berbagai jenis fase gerak sesuai dengan golongan senyawa kimia sebagai sasaran analisis. Evaluasi dapat dilakukan dengan dokumentasi foto hasil pewarnaan lempeng kromatografi dengan pereaksi yang sesuai.

#### 3.4.7.1 Identifikasi alkaloid (*Materia Medika*, 1995 dan Farnsworth, 1966)

4 mg ekstrak ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air, dipanaskan di penangas air selama 2 menit, didinginkan. Kemudian disaring dan ditampung filtrat (filtrat a). Filtrat a digunakan sebagai larutan percobaan selanjutnya.

- 1) 1 mL filtrat a, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes Pereaksi Boucharlat, terbentuk endapan coklat / hitam (positif alkaloid).
- 2) 1 mL filtrat a, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes Pereaksi Mayer, terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol (positif alkaloid).
- 3) 1 mL filtrat a, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes Pereaksi Dragendorff, terbentuk endapan jingga coklat (positif alkaloid).

#### 3.4.7.2 Identifikasi flavonoid (*Materia Medika*, 1995)

4 mg ekstrak ditambahkan 4 mL etanol 95% hingga ekstrak larut (larutan b).

- a) 2 mL larutan b ditambahkan 0,5 gram serbuk seng, kemudian ditambahkan 2 mL HCl 2N, didiamkan 1 menit. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat P.

Dikocok perlahan, kemudian didiamkan 2-5 menit. Terbentuk warna merah intensif (positif flavonoid).

- b) 2 mL larutan b ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat P. Dikocok perlahan. Terbentuk warna merah jingga hingga merah ungu (positif flavonoid) atau kuning jingga (flavon, kalkon, auron).
- c) Ekstrak ditambahkan aseton, dilarutkan. Kemudian ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat dan asam oksalat, dipanaskan hati-hati dan dihindarkan dari pemanasan berlebihan. Kemudian ditambahkan 10 mL eter. Diamati dengan sinar ultraviolet 366 nm. Larutan akan berfluoresensi kuning intensif (positif flavonoid).

Uji KLT : Sebanyak 20  $\mu$ L masing-masing fraksi ditotolkan pada lempeng KLT, fraksi petroleum eter dan etil asetat dieluasi dengan campuran Heksan : Etil Asetat = 7:3, sedangkan fraksi butanol dan metanol-air dieluasi dengan campuran Heksan : Metanol = 3:7. Lempeng kromatogram disemprot dengan  $AlCl_3$ , diangin-anginkan, diamati dengan sinar biasa dan sinar ultraviolet 366 nm (Wagner, 1984).

#### **3.4.7.3 Identifikasi sterol/terpen (Farnsworth, 1966)**

4 mg ekstrak digunakan untuk reaksi Liberman-Bouchard : 5 mL larutan eter diuapkan di dalam cawan penguap, ke dalam residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat, kemudian 1 tetes asam sulfat pekat. Filtrat mengandung sterol/terpen apabila terbentuk warna merah-hijau-violet-biru.

#### **3.4.7.4 Identifikasi tanin (Farnsworth, 1966)**

4 mg ekstrak kental ditambahkan 15 mL air panas. Kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit. Filtrat disaring (filtrat c).

- 1) Filtrat c sebanyak 1 ml ditambahkan beberapa tetes  $FeCl_3$  1 % menghasilkan warna hijau violet (positif tannin).
- 2) Filtrat c sebanyak 1 ml ditambahkan 3 ml gelatin membentuk endapan putih (positif tannin).

3) Filtrat c sebanyak 1 ml ditambahkan larutan natrium klorida-gelatin (1:10) membentuk endapan putih (positif tannin).

#### **3.4.7.5 Identifikasi saponin (*Materia Medika*, 1995)**

4 mg ekstrak ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, kemudian didiamkan selama 10 menit. Terbentuk buih yang mantap setinggi 1 hingga 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang.

#### **3.4.7.6 Identifikasi glikosida (*Materia Medika*, 1995)**

4 mg ekstrak ditambahkan 20 mL etanol 70%, kemudian ditambahkan 25 mL air dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok, didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari tiga kali, tiap kali dengan 20 mL campuran (3:1) kloroform P dan isopropanol. Kumpulan sari ditambahkan natrium sulfat anhidrat, disaring dan diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50°. Sisa penguapan dilarutkan dengan 2 mL metanol.

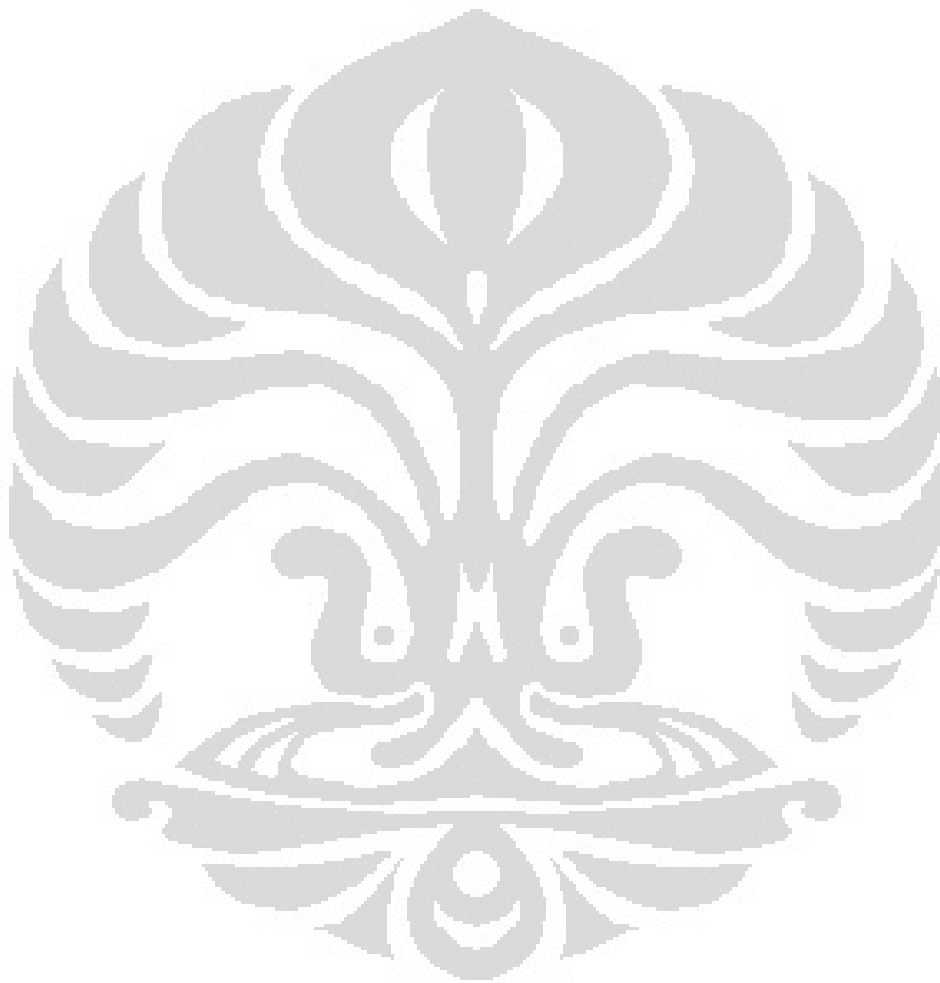
- 1) Larutan percobaan sebanyak 1 mL diuapkan hingga kering, sisanya ditambahkan 20 tetes asam asetat anhidrat P dan 1 tetes asam sulfat P. Hasil positif terbentuknya warna biru / hijau.
- 2) Larutan percobaan sebanyak 1 mL diuapkan hingga kering, sisanya dilarutkan dengan 2 mL air dan 5 tetes Molisch LP. Kemudian ditambahkan dengan hati-hati 2 mL asam sulfat P. Hasil positif terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan (Reaksi Molisch).

#### **3.4.7.7 Identifikasi kuinon dan antrakuinon (*Materia Medika*, 1995 dan Farnsworth, 1966)**

4 mg ekstrak kental ditambahkan 10 mL air panas. Kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit. Filtrat disaring. Pada 5 mL filtrat ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N, terbentuk warna merah (positif kuinon).

4 mg ekstrak dilarutkan dengan 5 mL asam sulfat 2N, dipanaskan sebentar, didinginkan, kemudian ditambahkan 10 mL benzen P, dikocok, didiamkan. Lapisan benzen dipisahkan, disaring, filtrat berwarna kuning menunjukkan adanya

antrakuinon. Lapisan benzen dikocok dengan 1 mL sampai 2 mL natrium hidroksida 2N, didiamkan, lapisan air berwarna merah intensif dan lapisan benzena tidak berwarna.





## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Penyiapan Bahan Uji**

##### **4.1.1 Penyiapan Simplisia Uji**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah ketapang (*Terminalia catappa* L.) dari famili Combretaceae, yang diperoleh dari sekitar lingkungan Universitas Indonesia dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense (LIPI), Cibinong. Determinasi dilakukan untuk memastikan bahwa tanaman tersebut adalah ketapang, dan hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 6. Buah ketapang yang digunakan adalah buah (beserta bijinya) yang tua tetapi belum matang / masih berwarna hijau, dan belum gugur. Buah ketapang yang digunakan beserta bijinya karena mengikuti prosedur dari penelitian sebelumnya. Buah ketapang dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan Gambar 4.2.

Buah ketapang yang telah dikumpulkan selanjutnya disortasi, dibersihkan dari pengotor dan dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Setelah selesai dicuci, buah ketapang ditiriskan pada temperatur kamar dan ditimbang berat buah segarnya. Buah tersebut kemudian diperkecil dengan cara ditumbuk, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka dan terlindung dari sinar matahari langsung selama waktu tertentu ( $\pm 7$  hari), karena kandungan air pada buah ketapang cukup banyak. Pengeringan dilakukan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, karena dengan mengurangi kadar air dapat mencegah penurunan mutu atau kerusakan simplisia dari pembusukan (Depkes RI, 1985).

Simplisia buah ketapang yang sudah cukup kering selanjutnya dimasukkan ke dalam lemari pengering dan ditimbang berat buah kering guna menghitung persentase perbandingan berat buah kering terhadap berat buah segar (susut pengeringan). Hasil susut pengeringan dapat dilihat pada Tabel 4.1. Simplisia yang telah kering disortasi kembali untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang tertinggal (Depkes RI, 1985). Simplisia yang telah disortir kemudian dibuat menjadi serbuk

dengan menggunakan blender, diayak dengan ayakan 40 mesh dan disimpan dalam wadah.

#### 4.1.2 Ekstraksi Simplisia

Serbuk simplisia kering sebanyak 1,5 kg diekstraksi dengan metode maserasi. Metode maserasi dilakukan dengan bantuan *shaker* selama enam jam menggunakan pelarut etanol 80% setinggi 3-5 cm diatas serbuk simplisia. Cara maserasi dipilih karena metode maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi cara dingin yang mudah dilakukan karena alat / caranya sederhana, dan memungkinkan senyawa aktif yang terkandung di dalam simplisia tidak rusak karena cara dingin dapat digunakan untuk simplisia yang tahan / tidak tahan akan pemanasan. Sedangkan metode ekstraksi cara panas hanya dapat digunakan untuk simplisia yang tahan akan pemanasan. Bila dibandingkan dengan metode cara dingin lain (perkolasi), metode maserasi dinilai lebih efisien, karena metode perkolasi membutuhkan waktu ekstraksi dan pelarut yang lebih banyak.

Etanol memiliki kemampuan ekstraksi yang tinggi untuk hampir semua senyawa bahan alam yang memiliki berat molekul rendah, seperti alkaloid, saponin, dan flavonoid (Samuelsson, 1999). Selain itu, pelarut yang biasa digunakan pada spektrofotometri UV-Vis (Harborne, 1987). Etanol seringkali dicampur dengan air untuk menginduksi pembengkakan partikel tanaman dan meningkatkan porositas dinding sel sehingga memudahkan proses difusi senyawa-senyawa dari dalam sel menuju pelarut, perbandingan campuran ideal etanol-air adalah 8:2 atau 7:3 (Samuelsson, 1999). Adapun alasan penggunaan etanol 80% (8:2) sebagai pelarut untuk metode maserasi adalah karena jumlah air pada etanol 80% lebih sedikit, sehingga dapat mempermudah proses penguapan pelarut dalam memperoleh ekstrak kental.

Maserasi dilakukan dengan bantuan *shaker* selama enam jam, kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 18 jam. Filtrat hasil ekstraksi kemudian disaring agar terpisah dari residunya. Residu kemudian diekstraksi kembali (remaserasi) hingga lima kali agar jumlah senyawa yang tersari dapat diperoleh lebih banyak. Seluruh filtrat yang diperoleh ditampung dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C hingga etanol menguap



seluruhnya. Selanjutnya ekstrak dikeringkan dengan menggunakan *freeze dry* (dengan sebelumnya dibekukan terlebih dahulu) untuk menghasilkan ekstrak etanol kering (dapat dilihat pada Lampiran 2). Selanjutnya ekstrak etanol kering yang diperoleh ditimbang untuk menghitung rendemen. Hasil ekstraksi dan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.2. Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (Depkes RI, 2000).

#### 4.1.3 Fraksinasi

Ekstrak kering etanol kemudian difraksinasi menggunakan pelarut dengan kepolaran yang semakin meningkat berturut-turut mulai dari pelarut nonpolar hingga pelarut polar yaitu petroleum eter, etil asetat, butanol dan metanol. Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman pada beberapa fraksi sesuai tingkat kepolarannya, sehingga dapat memisahkan senyawa kimia yang tidak diharapkan dan diperoleh senyawa aktif yang diduga memiliki aktivitas penghambatan terhadap  $\alpha$ -glukosidase. Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi menggunakan corong pisah. Ekstrak kering etanol didispersikan dengan air panas terlebih dahulu, kemudian dipartisi dengan pelarut petroleum eter dengan perbandingan 1:1, dikocok kuat selama  $\pm$  1 jam, lalu didiamkan hingga terbentuk dua lapisan dengan lapisan air yang berada di bagian bawah dan lapisan petroleum eter di bagian atas. Lapisan petroleum eter dipisahkan, kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh fraksi petroleum eter kental.

Lapisan air selanjutnya difraksinasi kembali dengan cara yang sama berturut-turut menggunakan pelarut etil asetat dan butanol hingga diperoleh fraksi etil asetat kental, fraksi butanol kental dan lapisan air. Lapisan air yang terakhir diperoleh diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga sedikit mengental, lalu ditambahkan metanol 100 mL dan dibiarkan menguap hingga diperoleh fraksi metanol-air kental. Fraksi petroleum eter, etil asetat, butanol dan metanol-air kental yang diperoleh kemudian ditimbang (Tabel 4.3) dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4<sup>0</sup>C.

## 4.2 Optimasi Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase

Optimasi aktivitas  $\alpha$ -glukosidase perlu dilakukan terlebih dahulu sebelum uji penghambatan  $\alpha$ -glukosidase sehingga diketahui kondisi yang optimal agar enzim bekerja secara optimal. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa hasil yang diperoleh dari penghambatan aktivitas enzim merupakan kerja dari ekstrak yang memiliki penghambatan terhadap aktivitas enzim tersebut. Optimasi dilakukan karena laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah suhu, pH, dan konsentrasi substrat (Murray, Granner, & Rodwell, 2009). Optimasi yang dilakukan adalah optimasi pH, waktu inkubasi, dan konsentrasi substrat dengan larutan enzim 0,0279 U/mL. Waktu inkubasi juga perlu dilakukan optimasi karena waktu inkubasi yang digunakan pada penelitian-penelitian mengenai penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase sebelumnya bervariasi dari 5 menit (Lee, *et al.*, 2007), 15 menit (Dewi, *et al.*, 2007; Choudhary, *et al.*, 2011) hingga 30 menit (Gao, *et al.*, 2010).

Unit enzim yang digunakan pada uji optimasi ini adalah 0,0279 U/mL. Enzim yang digunakan sebesar 1,2 mg dengan spesifikasi 16,5 mg enzim mengandung 26% protein dan terdapat 179 unit enzim tiap mg protein. Pemilihan unit enzim tersebut didasarkan pada hasil penelitian sebelumnya yang menggunakan unit enzim 0,0558 U/mL menghasilkan serapan yang tinggi/ di luar rentang serapan yang diharapkan. Pada pengukuran serapan p-nitrofenol, nilai serapan yang terbaca hendaknya antara 0,2-0,8. Pada rentang serapan tersebut kesalahan pembacaan cukup kecil, yaitu 0,5% (Gandjar & Rohman, 2007).

Pengujian aktivitas enzim dilakukan dengan cara mencampurkan substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida dan dapar fosfat (pH 7,0) diinkubasi pada 37°C selama 5 menit, kemudian ditambahkan larutan enzim  $\alpha$ -glukosidase 0,0279 U/mL dan diinkubasi kembali selama 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan natrium karbonat (Kikkoman, 2011). Produk yang dihasilkan dari reaksi antara  $\alpha$ -glukosidase dan p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang memberikan absorbansi maksimum sekitar 400 nm. Untuk mengoreksi hasil serapan blanko (kontrol), pengamatan dilakukan terhadap aktivitas enzim dengan menukar posisi antara enzim  $\alpha$ -glukosidase dan natrium karbonat. Pada kontrol, natrium karbonat ditambahkan

setelah inkubasi substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida dan dapar fosfat (pH 7,0). Setelah diinkubasi selama 15 menit, ditambahkan  $\alpha$ -glukosidase pada campuran reaksi tersebut. Hasil yang diperoleh dari kontrol dapat digunakan untuk melihat apakah masih ada produk yang terbentuk pada reaksi antara p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida dan  $\alpha$ -glukosidase saat kondisi campuran telah dibasakan terlebih dahulu dengan natrium karbonat.

Optimasi dan uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dilakukan dengan metode spektrofotometri karena metode spektrofotometri mudah dilakukan, tepat dilakukan untuk jumlah sampel yang banyak dan memberikan hasil yang akurat dengan cepat (Eisenthal & Danson, 2002). Rata-rata serapan yang diperoleh pada pengujian aktivitas larutan enzim 0,0279 U/mL adalah sebesar 0,5835, dan aktivitas enzim yang diperoleh adalah sebesar 24,63 U/mg (Tabel 4.4). Adapun syarat keaktifan yang terdapat pada label enzim yaitu lebih dari 10 U/mg. Maka hasil pengujian aktivitas larutan enzim tersebut menunjukkan bahwa larutan enzim 0,0279 U/mL masih memiliki aktivitas enzim yang baik.

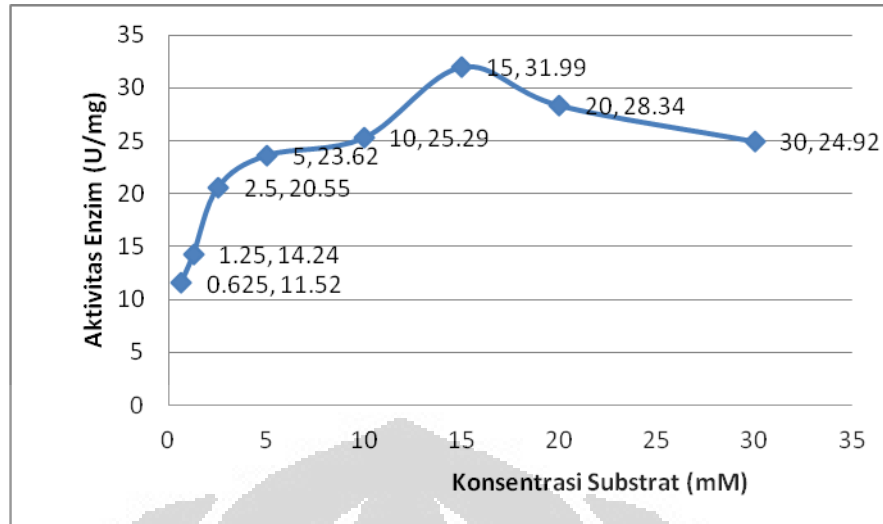
Uji optimasi pH dapar fosfat dilakukan dengan menggunakan dapar fosfat pH (6,8); (7,0); dan (7,2). Enzim bekerja optimal pada pH 6,0-9,0 dan stabil pada pH 5,0-10,0 (Kikkoman, 2011). Pada penggunaan dapar fosfat pH (7,0) diperoleh serapan tertinggi yang masih dalam rentang 0,2-0,8 (Tabel 4.5). Selain itu pada penelitian-penelitian penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase sebelumnya menunjukkan bahwa enzim bekerja optimal pada pH (6,8) (Gao, *et al.*, 2010; Gholamhoseinian, Fallah, Sharifi-far, & Mirtajaddini, 2008) dan pH (7,0) (Dewi, *et al.*, 2007). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penggunaan dapar fosfat pH (7,0) menghasilkan kondisi optimum untuk berlangsungnya reaksi enzimatis.

Uji optimasi waktu inkubasi dilakukan selama waktu tertentu ( 15; 20; 30 menit). Proses inkubasi terdiri dari dua tahap. Pada tahap pertama, inkubasi selama 5 menit bertujuan untuk memberikan waktu bagi larutan uji untuk mencapai suhu 37<sup>0</sup>C. Tahap pertama dilakukan sebelum penambahan enzim pada larutan uji. Sedangkan pada tahap kedua (setelah penambahan enzim pada larutan uji), inkubasi selama (15, 20, atau 30 menit) merupakan waktu inkubasi berlangsungnya reaksi enzimatis. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa waktu inkubasi 15 menit merupakan waktu inkubasi yang paling optimum, karena

semakin lama waktu inkubasi yang digunakan, semakin tinggi serapan yang dihasilkan (Tabel 4.6). Contohnya pada waktu inkubasi 20 menit diperoleh rata-rata serapan sebesar 0,7985, nilai tersebut hampir mendekati batas atas dari rentang serapan yang diharapkan. Bahkan, pada waktu inkubasi 30 menit diperoleh rata-rata serapan sebesar sebesar 1,2615, nilai tersebut telah di luar rentang serapan yang diharapkan.

Uji optimasi konsentrasi substrat dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi substrat 0,625 mM; 1,25 mM; 2,5 mM; 5 mM; 10 mM; 15 mM; 20mM; dan 40 mM (Tabel 4.7). Awalnya variasi konsentrasi tersebut mengacu pada variasi konsentrasi substrat yang digunakan pada uji optimasi penelitian sebelumnya yaitu 1,25 mM; 2,5 mM; 5 mM; 10 mM; 20 mM. Namun pada uji optimasi penelitian ini dilakukan pula tambahan beberapa konsentrasi substrat (0,625 mM; 15 mM dan 30 mM) untuk menyempurnakan grafik optimasi yang diperoleh, yang pada akhirnya menunjukkan konsentrasi substrat yang paling optimum.

Jika konsentrasi substrat meningkat, sementara semua kondisi lain dipertahankan tetap konstan, kecepatan awal yang terukur akan meningkat hingga mencapai nilai maksimum dan tidak lebih jauh lagi. Namun, hasil yang diperoleh menunjukkan terjadinya penurunan absorbansi dengan peningkatan konsentrasi substrat. Penurunan absorbansi ini mungkin disebabkan karena terbentuknya produk inhibitor dari reaksi enzim. Produk inhibitor tersebut adalah p-nitrofenil dan  $\alpha$ -D-glukopiranosida yang memiliki kemiripan struktur dengan substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida yaitu analog karbohidrat sehingga mungkin terjadi kompetisi antara senyawa-senyawa tersebut dalam menempati sisi aktif enzim sehingga absorbansi yang dihasilkan menurun (Gambar 4.3).



**Gambar 4.3.** Grafik Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Konsentrasi Substrat 0,625 mM hingga 30 mM

Kecepatan reaksi akan bertambah seiring meningkatnya konsentrasi substrat hingga mencapai suatu keadaan yang enzimnya sudah dapat dikatakan jenuh oleh substrat. Dalam hal ini, enzim ditafsirkan telah jenuh pada konsentrasi substrat 15 mM, dimana konsentrasi tersebut memberikan aktivitas enzim tertinggi yaitu 31,99 U/mg (Gambar 4.3). Dengan demikian, konsentrasi substrat yang digunakan untuk uji penghambatan aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase adalah 15mM.

#### 4.3 Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase

Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dilakukan dengan menggunakan larutan enzim 0,0279 U/mL dan larutan substrat dengan konsentrasi 15 mM. Pengujian dilakukan dengan variasi konsentrasi ekstrak dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi ekstrak terhadap daya hambat enzim dengan melihat nilai persen inhibisi serta mengetahui kekuatan penghambatannya terhadap enzim tersebut dengan melihat nilai  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  adalah konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50 % aktivitas enzim. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 0,125%; 0,25%; 0,5%; dan 1%.

Ekstrak ditimbang  $\pm$  100 mg dan ditambahkan DMSO beberapa tetes untuk mempermudah kelarutan. Setelah sudah cukup larut, larutan uji dilarutkan

dengan menggunakan pelarut dapar fosfat (pH 7,0) hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 1 %. Larutan uji tersebut diencerkan hingga konsentrasi 0,5 %; 0,25 %; dan 0,125 %.

Pengamatan aktivitas enzim dilakukan dengan membandingkan nilai absorbansi sampel (S) dengan blanko (B). Larutan blanko ( $B_1$ ) adalah larutan uji tanpa sampel/ekstrak, namun perlakuannya sama dengan larutan uji sampel. Kontrol blanko ( $B_0$ ) pun perlakuannya sama dengan kontrol sampel yaitu dengan menukar posisi penambahan enzim dan natrium karbonat, hanya saja dilakukan tanpa sampel.

Pengujian larutan sampel ( $S_1$ ) dilakukan untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas enzim yang diberikan oleh ekstrak dan akarbose (pembanding). Sedangkan pengujian larutan kontrol sampel ( $S_0$ ) dilakukan sebagai faktor koreksi terhadap larutan sampel ( $S_1$ ). Produk yang dihasilkan dari reaksi antara  $\alpha$ -glukosidase dan p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida diukur serapannya pada panjang gelombang 400 nm.

Sebelum dilakukan uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada fraksi uji, terlebih dahulu dilakukan uji penghambatan aktivitas pada pembanding/standar akarbose. Hal ini dilakukan dengan tujuan agar dapat mengetahui apakah fraksi uji tersebut merupakan fraksi aktif dengan cara membandingkan nilai  $IC_{50}$  fraksi uji dengan nilai  $IC_{50}$  akarbose. Akarbose dipilih sebagai pembanding/standar karena akarbose merupakan obat golongan penghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang mudah didapat, telah umum digunakan dan diakui penggunaannya secara internasional sebagai standar pengujian penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase. Selain itu, akarbose memiliki kemiripan struktur dengan substrat yang digunakan, karena keduanya merupakan bentuk karbohidrat.

Pengujian dilakukan dengan konsentrasi 0,125%; 0,25%; 0,5%; dan 1%. Hasil pengujian menunjukkan bahwa akarbose memiliki efek penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan nilai  $IC_{50}$  232,11 ppm (lihat Tabel 4.8). Jika dilihat dari nilai  $IC_{50}$  pada penelitian-penelitian sebelumnya, kemampuan akarbose menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase menunjukkan nilai  $IC_{50}$  437,46 ppm (Chan, Sun, Reddy & Wu, 2010), 128 ppm (Andrade-Cetto, Becerra-Jimenez, &

Cardenas-Vazquez, 2007), 336,7 ppm (Fatmawati, Kuniyoshi & Ryuichiro, 2011). Selain itu, akarbose dinilai kurang efektif dalam menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae*, akarbose lebih efektif dalam menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari mamalia seperti sukrase dan maltase. (Kim, Nam, Kurihara, & Kim, 2008; Shinde, *et al.*, 2008).

Semua fraksi uji merupakan fraksi aktif. Hasil pengujian secara *in vitro* pada semua fraksi uji menunjukkan penghambatan aktivitas enzim yang lebih baik dibandingkan akarbose, karena diperoleh nilai  $IC_{50}$  semua ekstrak uji lebih rendah dibandingkan dengan akarbose (lihat Tabel 4.13). Semakin rendah nilai  $IC_{50}$ , semakin tinggi penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase. Hal ini mungkin disebabkan karena ekstrak kasar mengandung beberapa senyawa yang mampu menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase sehingga menghasilkan efek sinergis (Chan, Sun, Reddy & Wu, 2010; Kim, Nam, Kurihara, & Kim, 2008). Namun mengingat akarbose merupakan obat golongan penghambat  $\alpha$ -glukosidase yang telah diakui penggunaannya secara internasional sebagai standar pengujian penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase (baik secara *in vivo*, maupun secara *in vitro*) memiliki nilai  $IC_{50}$  yang besar, kemungkinan fraksi dengan nilai  $IC_{50}$  sangat kecil belum tentu memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang baik pada pengujian secara *in vivo*. Fraksi yang memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase paling tinggi adalah fraksi etil asetat dengan nilai  $IC_{50}$  2,94 ppm, sedangkan fraksi yang memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase paling rendah adalah fraksi metanol-air dengan nilai  $IC_{50}$  14,03 ppm.

Hasil pengujian fraksi petroleum eter menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase cukup tinggi dengan nilai  $IC_{50}$  4,52 ppm. Hal ini mungkin disebabkan karena adanya kandungan triterpenoid yang cukup tinggi pada fraksi petroleum eter. Buah ketapang mengandung sianidin-3-glukosida, corilagin (Hecht, *et al.* 1992), asam elagat (Tan, *et al.*, 1991), asam galat (Dorsch, 1991), pentosan, triterpenoid, dan tannin. Berdasarkan literatur yang diperoleh, dilaporkan bahwa beberapa triterpenoid yang terdapat pada banyak tanaman dilaporkan memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase (Nguyen, *et al.*, 2010; Rahman, *et al.*, 2008;

Matsuda *et al.*, 1999; Kardono, *et al.*, 2002). Sebagai salah satu contoh dari tanaman lain, dilaporkan bahwa kandungan triterpenoid pada fraksi petroleum eter *Castanea mollissima* Blume memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase (Gao, *et al.*, 2010).

**Tabel 4.13.** Hasil Uji Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase

Uji	IC <sub>50</sub> (ppm)
Akarbose (Pembanding)	232,11
Ekstrak Etanol	3,02
Fraksi Petroleum Eter	4,52
Fraksi Etil Asetat	2,94
Fraksi Butanol	5,00
Fraksi Metanol-Air	14,03

Pada pengujian fraksi uji diperlukan pengenceran kembali terhadap konsentrasi larutan uji karena hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak pada konsentrasi 0,25%-1% memberikan % inhibisi yang terlalu besar (mendekati 100%) sehingga IC<sub>50</sub> bernilai negatif. Titik-titik yang akan diplot untuk menghasilkan persamaan regresi linear menjadi tidak cukup baik sehingga nilai a pada persamaan  $y = a + bx$ , lebih dari 50. Misalnya pada fraksi etil asetat konsentrasi 1%; 0,5%; 0,25%; dan 0,125% menghasilkan % inhibisi masing-masing 99,3913%; 95,6522% ; 87,1304% ; dan 79,0435%, sehingga nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh adalah -71,8354 ppm. Untuk mendapatkan nilai IC<sub>50</sub> yang tepat, diperlukan pengenceran kembali fraksi etil asetat konsentrasi 0,125% menjadi konsentrasi 0,0625%; 0,03125%; dan 0,015625 %. Setelah dilakukan pengenceran, didapatkan % inhibisi masing-masing 50,1739%; 41,8261%; dan 29,3913%, sehingga didapatkan nilai IC<sub>50</sub> 2,94 ppm. Data penghambatan aktivitas enzim oleh semua fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.9- 4.12.



#### 4.4 Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase

Kinetika enzim dilakukan untuk mengetahui jenis penghambatan yang dilakukan oleh sampel terhadap enzim. Untuk menganalisis kinetika enzim, dapat digunakan plot Lineweaver-Burk, dimana sumbu x adalah satu per konsentrasi substrat ( $1/S$ ) sedangkan sumbu y adalah satu per kecepatan reaksi enzim ( $1/V$ ). Kinetika enzim dapat diketahui dengan melihat aktivitasnya terhadap kenaikan konsentrasi substrat, dimana konsentrasi yang digunakan adalah 5 mM; 10 mM; 15 mM dan 20 mM.

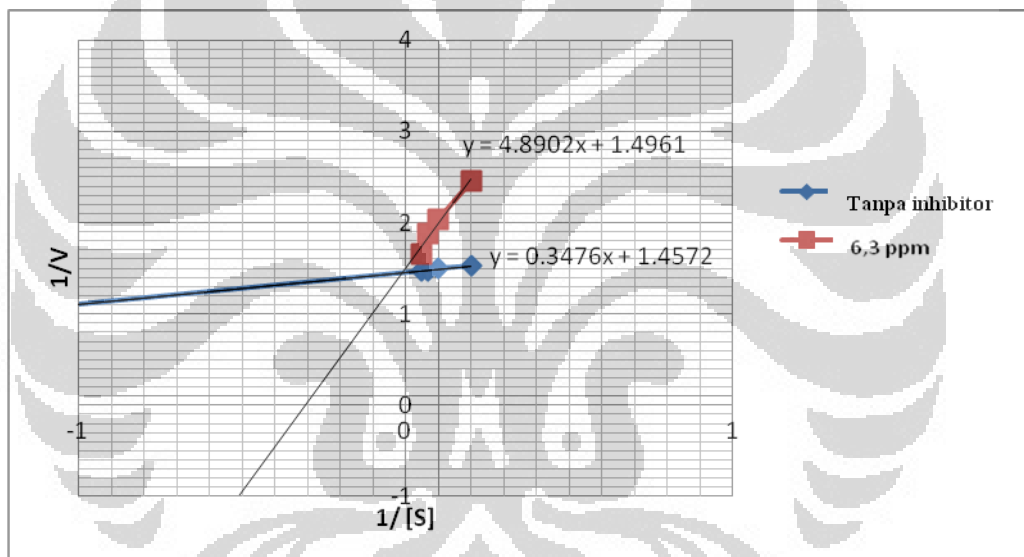
Penghambat yang dipilih adalah fraksi etil asetat. Hal ini didasarkan pada nilai  $IC_{50}$  yang paling kecil diantara fraksi uji yang lain atau dengan kata lain fraksi etil asetat merupakan fraksi yang paling kuat aktivitas penghambatannya terhadap  $\alpha$ -glukosidase dibandingkan fraksi uji lain. Konsentrasi fraksi etil asetat yang digunakan adalah 0,7875 ppm; 1,575 ppm; 3,15 ppm; 6,3 ppm. Data hasil uji kinetika penghambatan aktivitas enzim dapat dilihat pada Tabel 4.14.

Plot Lineweaver-Burk, akan menunjukkan mekanisme dari penghambatan fraksi etil asetat terhadap  $\alpha$ -glukosidase. Mekanisme penghambatannya dapat berupa inhibisi kompetitif klasik, inhibisi nonkompetitif, ataupun gabungan dari dua mekanisme tersebut.

Berdasarkan hasil plot Lineweaver-Burk, saat  $1/[S]$  mendekati 0, kecepatan maksimum reaksi ( $V_{max}$ ) tidak dipengaruhi oleh adanya inhibitor. Maka pada saat konsentrasi substrat tinggi,  $V_{max}$  pada sistem dengan inhibitor sama dengan atau mendekati  $V_{max}$  dengan sistem tanpa inhibitor. Inhibitor yang bekerja secara kompetitif tidak mempengaruhi nilai  $V_{max}$ , tetapi meningkatkan nilai  $K_m$  (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).

Berdasarkan persamaan yang diperoleh, nilai  $V_{max}$  dan  $K_m$  dapat ditentukan. Pada sistem tanpa inhibitor diperoleh persamaan  $y = 1,4572 + 0,3476x$  dengan nilai  $V_{max}$  0,69  $\mu\text{mol/mL}$  menit dan nilai  $K_m$  0,24  $\mu\text{mol/mL}$ . Sedangkan pada sistem dengan inhibitor 6,3 ppm diperoleh persamaan  $y = 1,4961 + 4,8907x$  dengan nilai  $V_{max}$  0,67  $\mu\text{mol/mL}$  menit dan nilai  $K_m$  3,27  $\mu\text{mol/mL}$ . Hasil ini menunjukkan bahwa  $V_{max}$  pada sistem dengan inhibitor sama dengan atau mendekati  $V_{max}$  dengan sistem tanpa inhibitor dan ada peningkatan nilai  $K_m$ . Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten dapat dilihat pada Tabel 4.15.

Hasil plot menunjukkan bahwa fraksi etil asetat buah ketapang (*Terminalia catappa* L.) dengan konsentrasi 6,3 ppm memiliki mekanisme penghambatan kompetitif. Pernyataan tersebut dapat dilihat dari hasil plot Lineweaver-Burk antara sistem tanpa inhibitor dengan sistem dengan inhibitor 6,3ppm yang menunjukkan adanya perpotongan kedua persamaan garis di sumbu y (penghambatan kompetitif). Inhibitor yang memiliki mekanisme penghambatan kompetitif memiliki struktur senyawa yang menyerupai substrat atau disebut sebagai analog substrat (Murray, Granner, & Rodwell, 2009). Plot Lineweaver-Burk fraksi etil asetat 0,125% (6,3 ppm) dengan konsentrasi substrat PNPG 5mM; 10 mM; 15 mM; dan 20 mM terlihat pada Gambar 4.4.



**Gambar 4.4.** Plot Lineweaver-Burk Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Etil Asetat Buah Ketapang 0,125 % (6,3 ppm)

#### 4.5 Pola Kromatogram dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi Aktif

Semua fraksi aktif diidentifikasi secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang tertarik dengan pelarut masing-masing fraksi, sehingga dapat diduga golongan senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap  $\alpha$ -glukosidase pada ekstrak yang diperoleh. Golongan senyawa kimia yang diidentifikasi adalah alkaloid, flavonoid, terpen, tanin, saponin, glikosida dan

antrakuinon. Hasil identifikasi golongan senyawa dari fraksi etil asetat terlihat pada Tabel 4.16.

**Tabel 4.16.** Hasil Identifikasi Golongan Senyawa

No	Golongan Senyawa	Ekstrak Etanol	Fraksi Petroleum Eter	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Butanol	Fraksi Metanol-Air
1.	Alkaloid	+	-	-	+	+
2.	Flavonoid	-	-	-	-	-
3.	Terpen	+	+	+	-	-
4.	Tanin	+	-	-	-	+
5.	Saponin	-	-	-	-	-
6.	Glikosida	+	-	+	+	+
7.	Antrakuinon	-	-	-	-	-

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

#### 4.5.1 Alkaloid

Pada umumnya, senyawa alkaloid ditemukan dalam bentuk garam yang bersifat larut air di dalam tanaman, sehingga golongan senyawa ini seharusnya dapat tertarik dengan cukup baik dalam pelarut etanol 80% untuk kemudian diuji langsung dengan pereaksi-pereaksi alkaloid. Untuk menghindari hasil uji yang sifatnya positif atau negatif palsu, perlu dilakukan penarikan senyawa alkaloid terlebih dahulu. Tahap penarikan ini dilakukan dengan menggunakan pelarut air dalam suasana asam yaitu air dan HCl 2N dengan perbandingan 1:9. Setelah dimurnikan, larutan diuji dengan pereaksi pengendap (Mayer, Dragendorf, dan Bouchardart). Namun, senyawa alkaloid dengan struktur nitrogen heterosiklik, amin oksida, dan alkaloid kuartener tidak dapat terdeteksi dengan pereaksi pengendap. Hal ini akan menghasilkan negatif palsu pada pengujian alkaloid dengan pereaksi pengendap (Farnsworth, 1966). Larutan uji dengan pereaksi Mayer dan Dragendorf akan membentuk senyawa adisi yang tidak larut,

sedangkan dengan pereaksi Bouchardart akan membentuk senyawa kompleks bebas (Depkes, 1995).

Berdasarkan hasil identifikasi (Tabel 4.16), alkaloid terkandung pada ekstrak etanol, fraksi butanol dan fraksi metanol-air. Pada fraksi petroleum eter dan etil asetat tidak mengandung senyawa alkaloid karena dari hasil reaksi Mayer, Dragendorff dan Bouchardat tidak terbentuk endapan/ jernih.

#### **4.5.2 Flavonoid**

Pada pengujian, ekstrak etanol dan semua fraksi diuji dengan ketiga pereaksi yaitu dengan serbuk Zn, serbuk Mg, dan serbuk asam borat-asam oksalat. Hasil menunjukkan tidak ada satu pun hasil positif dengan ketiga pereaksi flavonoid tersebut (pada Tabel 4.16).

Untuk memastikan kembali keberadaan senyawa golongan flavonoid, dilakukan tambahan pengujian KLT yang difluoresensi dibawah sinar UV dengan  $\lambda = 366$  nm dengan penyemprot  $\text{AlCl}_3$  10%. Fluoresensi ekstrak dibandingkan dengan standar quersetin. Ekstrak mengandung flavonoid apabila menghasilkan fluoresensi hijau kuning (Harborne, 1987). Profil kromatogram dapat dilihat pada Gambar 4.5-4.6, sedangkan perhitungan harga Rf dapat dilihat pada Tabel 4.17-4.18. Hasil KLT menunjukkan bahwa pada fraksi etil asetat, butanol dan metanol-air terdapat flavonoid.

#### **4.5.3 Terpen**

Senyawa terpen umumnya merupakan senyawa yang larut dalam lemak (Harborne, 1987). Maka berdasarkan tingkat kelarutannya, dalam pengujian golongan senyawa, terpen ditarik dengan eter. Terpen dapat diidentifikasi dengan tes Liebermann-Bouchard. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, merah muda, atau violet (Farnsworth, 1966). Berdasarkan hasil identifikasi (Tabel 4.16), terpen terkandung pada ekstrak etanol, fraksi petroleum eter, dan etil asetat.

#### **4.5.4 Tanin**

Tanin memiliki kemampuan dalam menyambung-silang protein, dan jika bereaksi dengan protein, dapat membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air (Harborne, 1987). Maka identifikasi tanin dapat dilakukan dengan larutan gelatin, dan natrium klorida-gelatin. Hasil positif pada kedua pereaksi ini dikonformasi dengan pereaksi larutan besi (III) klorida 1%. Hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna biru, biru-hitam, hijau, atau biru hijau (Farnsworth, 1966). Berdasarkan hasil pengujian (Tabel 4.16), menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan fraksi metanol-air mengandung tanin.

#### **4.5.5 Saponin**

Golongan senyawa saponin mempunyai sifat khas yang dapat digunakan sebagai dasar untuk merancang metode penapisan yang sederhana. Dalam cairan, saponin dapat membentuk busa setelah pengocokan dan busa bertahan. Metode identifikasi ini digunakan karena mudah dilakukan, cepat, dan hanya membutuhkan sedikit peralatan. Bila busa yang terbentuk hanya sedikit, dan hanya bertahan selama beberapa menit, hal ini mungkin disebabkan adanya senyawa asam, atau rendahnya konsentrasi saponin (Farnsworth, 1966).

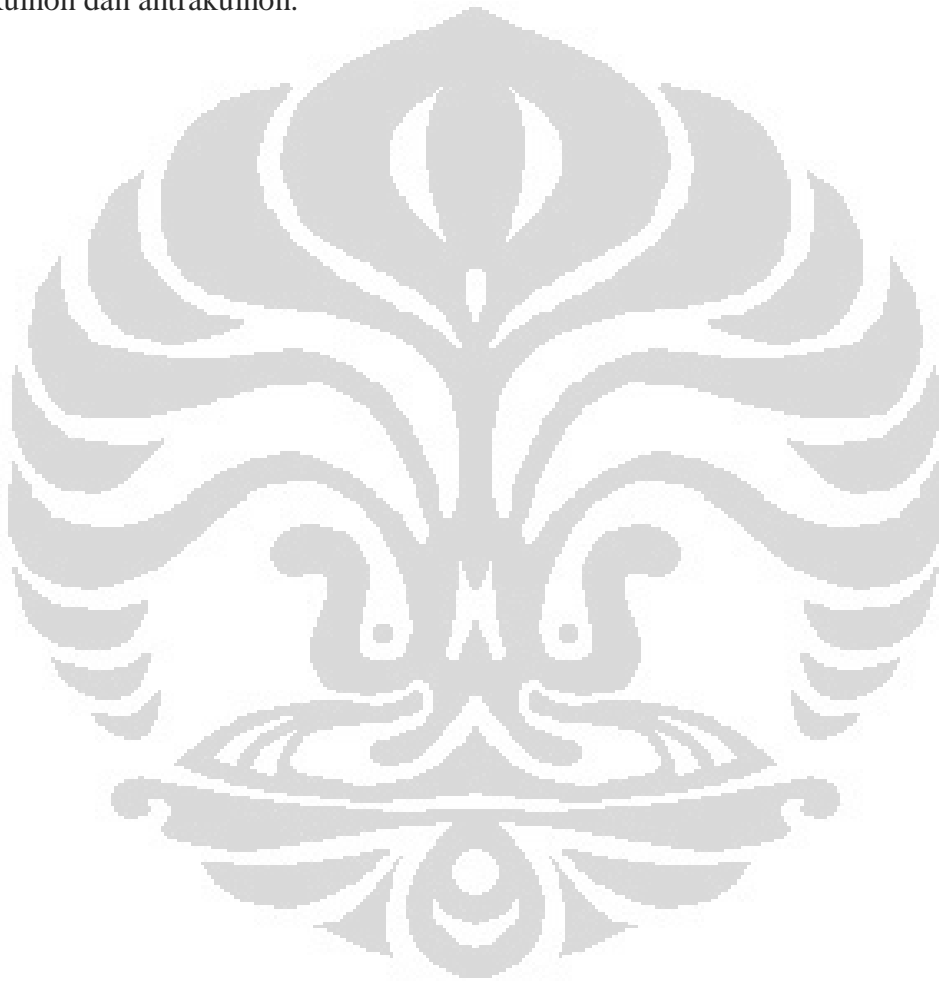
Berdasarkan hasil identifikasi, saponin tidak terdapat pada ekstrak etanol dan semua fraksi (Tabel 4.16). Memang buih terbentuk sedikit, tetapi buih tersebut tidak stabil dan hilang setelah penambahan HCl 2N dalam waktu kurang dari 10 menit sehingga disimpulkan hasil negatif terhadap saponin.

#### **4.5.6 Glikosida**

Pada proses identifikasi, gula hasil hidrolisis dapat diidentifikasi dengan tes Mollisch. Hidrolisis dapat dilakukan pemanasan dengan larutan asam (Sirait, 2007). Maka pada proses identifikasi, ekstrak dipanaskan selama 10 menit dalam 15 ml asam klorida 10%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin ungu. Berdasarkan hasil identifikasi, glikosida terkandung pada ekstrak etanol, fraksi etil asetat, butanol dan metanol-air (Tabel 4.16).

#### 4.5.7 Antrakuinon

Antrakuinon di alam kemungkinan dalam bentuk bebas, glikosida, atau antron (bentuk tereduksi). Untuk mengidentifikasi antrakuinon, perlu ditambahkan asam sulfat 2N dan dipanaskan terlebih dahulu untuk menghidrolisis antrakuinon yang berada dalam bentuk glikosidanya. Kemudian, dilakukan pengujian terhadap senyawa antrakuinon. Berdasarkan hasil pengujian (Tabel 4.16), menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan semua fraksi tidak mengandung kuinon dan antrakuinon.





## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Berdasarkan uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada fraksi petroleum eter, etil asetat, butanol dan metanol-air, diperoleh hasil nilai IC<sub>50</sub> secara berturut-turut adalah 4,52 ppm; 2,94 ppm; 5,00 ppm; dan 14,03 ppm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa fraksi yang memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tertinggi dari keempat fraksi tersebut adalah fraksi etil asetat buah ketapang dengan mekanisme penghambatan kompetitif. Hasil identifikasi golongan kimia menunjukkan bahwa fraksi etil asetat buah ketapang mengandung terpen, flavonoid, dan glikosida.

#### 5.2. Saran

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





## DAFTAR ACUAN

- Abrahamson, M.J. (2004). Optimal glyceemic control in type 2 diabetes mellitus: Fasting and postprandial glucose in context. *Arch Intern Med* 164: 486-491 .
- Adisakwattana, S., Lerdsuwankij, O., Poputtachai, U., Minipun, A., & Suparpprom, C. (2011). Inhibitory activity of *Cinnamon* bark species and their combination effect with acarbose against intestinal  $\alpha$ -glukosidase and pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Springer* 66: 143-148.
- Ahmed, S.M., Vrushabendra, S.B., P Gopkumar R.D., & Chandrashekara, V.M. (2005). Anti-diabetic activity of *Terminalia catappa* Linn. leaf extracts in alloxan-induced diabetic rats. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* 4: 36-39.
- Alwan, A.A.S. (1994). *Management of diabetes mellitus: Standards of care and clinical practice guidelines*. Alexandria, Egypt: WHO.
- Andrade-Cetto, A., Becerra-Jimene, J., & Cardenas-Vazquez, R. (2007). Alfa-glukosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 27-32.
- Bastyr, E.J., Stuart, C.A., Brodows, R.G., Schwartz, S., Graf, C.J., Zagar, A. & Robertson, K.E. (IOEZ Study Group). (2000). Therapy focused on lowering postprandial glucose, not fasting glucose, may be superior for lowering HbA1c. *Diabetes Care* 23: 1236-1241.
- Bayer. (2008). *Precose (acarbose tablets)*. USA: Bayer Healthcare Pharmaceuticals Inc.
- British Pharmacopoeia 2009*. (2008). London: Crown.
- Chan, H.H., Sun, H.D., Reddy, M.V.B., & Wu, T.S. (2010). Potent  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors Purified from the Roots of *Panax japonicus* C.A. Meyer var. major. *Phytochemistry*, 71 (11): 1360-1364.
- Chisholm-Burns, M.A., *et al.* (2008). *Pharmacotherapy principles and practice*. New York : McGraw-Hill Companies, Inc, 649; 657.

- Choudhary, M.I., *et al.* (2011). Cyclopeptide alkaloids of *Ziziphus oxyphylla* Edgwas novel inhibitors of  $\alpha$ -glukosidase enzyme and protein glycation. *Phytochem. Lett*, 261: 1-3.
- Corwin, E.J. (2001). *Buku saku patofisiologi.ter. dari Handbook of pathophysiology oleh Brahm U. Pendit*. Jakarta: EGC, 542-547.
- Coulson, C.J. (1994). *Molecular mechanism of drugs action (2nd ed.)*. London: Taylor & Francis.
- Dhanawansa, R., Faridmoayer, A., Merwe, G.V.D., Li,Y.X., & Scaman,C.H. (2002). Overexpression, purification, and partial characterization of *Saccharomyces cerevisiae* processing alpha glucosidase I. *Oxford Journals*, 229-234.
- Dewi, R.T., Yetty, M.I., Hanafi, M., Kardono, L.B.S., Marisa, A., Indah, D.D., & Sofna, D.S.B. (2007). Inhibitory effect of koji *Aspergillus terreus* on  $\alpha$ -glukosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(18), 3131-3135.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979a). *Farmakope Indonesia edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia,772-784.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979b). *Materia Medika Indonesia jilid III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.141-150; 167-173.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1985). *Cara pembuatan simplisia*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Materia Medika Indonesia jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 482.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Materia Medika Indonesia jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 308; 322; 324; 328; 333-337.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1-33.
- Dipiro, Joseph T., Robert L. Talbert., Gary C. Yee., Gary R. Matzke., Barbara G. Wells., & L.Michael Posey. (2005). *Pharmacotherapy a pathophysiologic approach*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc, 1333-1352.
- Dorsch, W., Wagner, H.(1991). *New antiasthmatic drugs from traditional medicine?* International Archives of Allergy and Applied Immunology 94 : 262–265.
- Eisenthal, R., & Danson, M.J. (Ed). (2002). *Enzyme assays (2<sup>nd</sup> ed.) A practical approach*. New York: Oxford University, 214-256.
- Faridmoayer, A., & Scaman, C.H. (2005). Binding residues and catalytic domain of soluble *Saccharomyces cerevisiae* processing alpha-glucosidase I. *Glycobiology*, 15(12): 1341–1348.
- Farnsworth, N.R. (1966). *Biological and phytochemical screening of plants*. *Journal of Pharmaceutical Science* 55(3), 226-276.
- Fatmawati, S., Shimizu, K., & Kondo, R. (2011). Ganoderol B: A potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Phytomedicine* 18, 1053-1055.
- Fitriana, Kun. (2011). *Uji aktivitas antidiabetes dengan metode penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase dan skrining fitokimia pada beberapa tanaman indonesia*. Depok : Universitas Indonesia.
- Gandjar, I.G & Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar Yogyakarta.
- Gao, H., Huang, Y., Xu, P., & Kawabata, J. (2007). Inhibitory Effect on  $\alpha$ -glucosidase by the Fruits of *Terminalia chebula* Retz. *Fod Chemistry*, 105, 628-634.
- Gao, H.Y, Wu, D., Lu, C., Xu, X.M, Huang, J., Sun, B.H, & Wu, L.J. (2010). Constituens from the testas of *Castanea mollissima* Blume with  $\alpha$ -glukosidase inhibitory activity. *J. Asian Nat. Prod. Res.*12, 144-149.

- Gholamhoseinian, A., Fallah, H., Sharifi-far, F., & Mirtajaddini, M. (2008). *The Inhibitory Effect of Some Irian Plants on the Alpha Glucosidase. Irianian Journal of Basic Medical Sciences* 11 (1), 1-9.
- Goldstein, Barry J. (Ed). (2008). *Type 2 Diabetes : Principles and Practice (2nd. Ed)*. Edition USA : Informa Healthcare.
- Harborne, J.B. (1987). *Metode fitokimia. ter. dari Phytochemical methods oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro*. Bandung: Penerbit ITB; 47-69; 102-109; 123; 245.
- Hecht, S.M., Berry D.E., MacKenzie L.J., Busby R.W., & Nasuti C.A.(1992). A strategy for identifying novel, mechanistically unique inhibitors of topoisomerase I. *Journal of Natural Products* 55, 401–413.
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan berguna indonesia III*. Jakarta : Badan Litbang Kehutanan, 1502.
- Holman, R.R., Cull C.A., & Turner R.C. (1999). A randomized double-blind trial of acarbose in type 2 diabetes shows improved glycemic control over 3 years (U.K. Prospective Diabetes Study 44). *Diabetes Care* 22 : 960-964.
- Hsieh, P.C., Huang, G.J., Ho Y.L., Lin, Y.H., Huang, S.S., Chiang, Y.C., Tseng, M.C., Chang, Y.S. (2010). Activities of antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and aldose reductase inhibitors of the aqueous extracts of four *Flemingia* species in Taiwan. *Bot. Stud*, 51, 293-302.
- Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia (ISFI). (2007). *Informasi spesialite obat Indonesia*. Jakarta : PT. ISFI, 181.
- International Diabetes Federation Diabetes Atlas. (2006). *The Global Burden*. 2 agustus 2011, <http://www.diabetesatlas.org/content/global-burden>.
- Jones, S.B., & Luchsinger, A.E. (1987). *Plant systematics (2<sup>nd</sup> ed.)*. New York : McGraw-Hill Companies, Inc.
- Joo, H.J., *et al.* (2006). The hypoglycemic effect of *Saururus chinensis* Baill in animal models of diabetes mellitus. *Food Science and Biotechnology* 15: 413-417.

- Kardono, L.B.S, Basuki, T., Trianadewi, R., & Kawanishi, K. (2002). Chemical constituents of *Scleroderma aurantium* I: A new triterpene, 3, 25-dihydroxy-22-acetoxyl-lanosta-8,23-diene. *Eurasian J. Forest. Res.* 5, 33-37.
- Kikkoman. (2001).  $\alpha$ -Glucosidase ( $\alpha$ GLS-SE) from recombinant *E. Coli*, 95-98.
- Kim, K.Y., Nam, K.A., Kurihara, H., & Kim, S.M. (2008). Potent  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors Purified from the Red Alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry*, 69: 2820-2825.
- Kok, Tjie. (1997). *Spektrofotometri UV-VIS: Aplikasi Kuantitatif*. Kristal 14 :1-4.
- Lee, S.K., Hwang, J.Y., Song, J.H., Jo, J.R., Kim, M.J., Kim, M.E., & Kim, J.I. (2007). Inhibitory activity of *Euonymus alatus* against alpha-glucosidase in vitro and in vivo. *Nutrition Research ang Practice*, 1(3), 184-188.
- Lemmens, R.H.M.J & Soetjipto, N.W. (1992). *Plant resources of South-East Asia 3: Dye and tannin-producing plants*. PROSEA, Bogor, 120.
- Linn, W.D., Wofford, M.R., O'Keefe, M.E., & Pose, L.M. (2009). *Pharmacotherapy in primary care*. New York: McGraw-Hill, 279-298.
- Matsuda, H., Murakami, T., Yashiro, K., Yamahara, J., & Yoshikawa, M. (1999). Antidiabetic principles of natural medicines, IV. Aldose reductase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from the roots of *Salacia oblonga* WALL. (Celastraceae): structure of a new friedelane-type triterpene, kotalagenin 16-acetate. *Chem. Pharm. Bull.* 47, 1725-1729.
- Medicinal herb index in Indonesia (Indeks tumbuhan-tumbuhan di Indonesia)*. (1986). Jakarta: PT Eisai Indonesia, 85.
- Murray, R.K., Granner, D.K., & Rodwell, V.W. (2009). *Biokimia harper edisi 27 ter. dari Harper's biochemistry 27<sup>th</sup> oleh Brahm U.Pendit*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 53;65; 68-74.

- Nagappa, A.N., Thakurdesai, P.A., Venkat, N.R., & Jiwan, S. (2003). Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn fruits. *Journal of Ethnopharmacology* 88 : 45-50.
- Nguyen, X.N, Kiem, P.V, Minh, C.V, Ban, N.K, Cuong, N.X, Tung, N.H, Ha, L.M, Ha, D.T, Tai, B.H, & Quang, T.H. (2010).  $\alpha$ -Glucosidase inhibition properties of cucurbitane-type triterpene glycosides from the fruits of *Momordica charantia*. *Chem. Pharm. Bull.* 58, 720-724.
- Nishida, *et al.* (2000). 1-Deoxyinojirimycin an  $\alpha$ -glucosidase inhibition , markedly improves postischemic left ventricular disfunction. *Heart Vessels.* 15 (6): 268-273.
- Poedjiadi, Anna. (1994). *Dasar-dasar biokimia*. Jakarta : UI-Press, 140-158.
- Rahman, A., Zareen, S., Choudary, M.I, Akhtar, M.N.,& Khan, S.N. (2008).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of triterpenoids from *Cichorium intybus*. *J. Nat. Prod.* 71, 910-913.
- Sastrohamidjojo, H. (1985). *Kromatografi*. Yogyakarta: Liberty, 26-30.
- Samuelsson, G. (1999). *Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy (4<sup>th</sup> ed.)*. Swedia: Apotekarsocieteten.
- Sels, J.P.J., Huijberts, M.S.P.,& Wolffenbuttel, B.H.R. (1999). Miglitol, a new  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *Expert Opin Pharmacother*,(1): 149-156.
- Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Hu, B., Kumar, S., Placido, J., Zito, S.W. (2008).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) skeels seed kernel in vitro and in goto-kakizaki (GK) rats. *Carbohydr. Res.*, 343, 1278–1281.
- Shoei-Sheng Lee, Hsiao-Ching, & Chien-Kuang. (2008). Acylated flavonol monorhamnosides,  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, from *Machilus philippinensis*. *Phytochemistry*, 69, 2347–2353.
- Soumyanath, A. (2006). *Traditional medicines for modern time Antidiabetic plant*. New York: Taylor & Francis Group.
- Sugeng, K.L.B., Triadi, B., Rizna, T., & Kazuko, K. (2002). Chemical constituents of *Scleroderma aurantium* I: A new triterpene 3,25-dihydroxy-22-acetoxyl-lanosta-8,23-diene. *Eurasia J. For. Res:* 33-37.

- Sugiwati, S., Setiasih, 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.
- Sukandar, E.Y., Andrajati, R., Sigit, J.I., Adnyana, I.K., Setiadi, A.A.P., & Kusnandar. (2008). *Isofarmakoterapi*. Jakarta: PT. ISFI Penerbitan, 26-36.
- Tan, G.T., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., Hughes, S.H. (1991). Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *Journal of Natural Products* 54: 143-154.
- Teotia, S., & Singh, M. (1997). Hypoglycemic effect of *Prunus amygdalus* seeds in albino rabbits. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35 : 295-296.
- Tjay, T.H., & Rahardja, K. (2007). *Obat-obat penting*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo, 738-754.
- Wafo, *et al.* (2011). Kaurane-type diterpenoids from *Chromolaena odorata*, their X-ray diffraction studies and potent  $\alpha$ -glucosidase inhibition of 16-kauran-19-oic acid. *Fitoterapia*, 82; 642-646.
- Wagner, H. (1984). *Plant drug analysis : a thin layer chromatography atlas*. New York: Springer, 163-165.
- Wells, B.G., Dipiro, J.T., Schwinghammer, T.L., & Dipiro, C.V. (2009). *Pharmacotherapy handbook seventh edition*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc, 210; 212; 215-220.
- Zanatta, L., de Sousa, E., Cazarolli, L.H., Junior, A.C., Pizzolatti, M.G., Szpoganicz, B. (2007). Effect of crude extract and fraction from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. *Ethnopharmacol* 109: 151-155.
- Zeng, Y-C., & Elbein, A.D. (1998). Purification to homogeneity and properties of plant glucosidase I. *Arch. Biochem. Biophys.*, 355, 26-34.





# **GAMBAR**



**Gambar 3.1.** Timbangan Analitik



**Gambar 3.2.** Rotary Vacuum Evaporator



**Gambar 3.3.** Inkubator

Keterangan: Inkubator merupakan alat yang digunakan untuk menginkubasi larutan uji pada suhu 37°C.



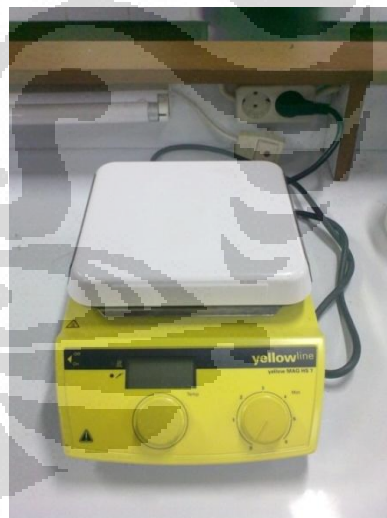
**Gambar 3.4.** *Vortex Mixer*



**Gambar 3.5.** Pipet Mikro



**Gambar 3.6.** *Freeze Dry*



**Gambar 3.7.** *Magnetic Stirrer*



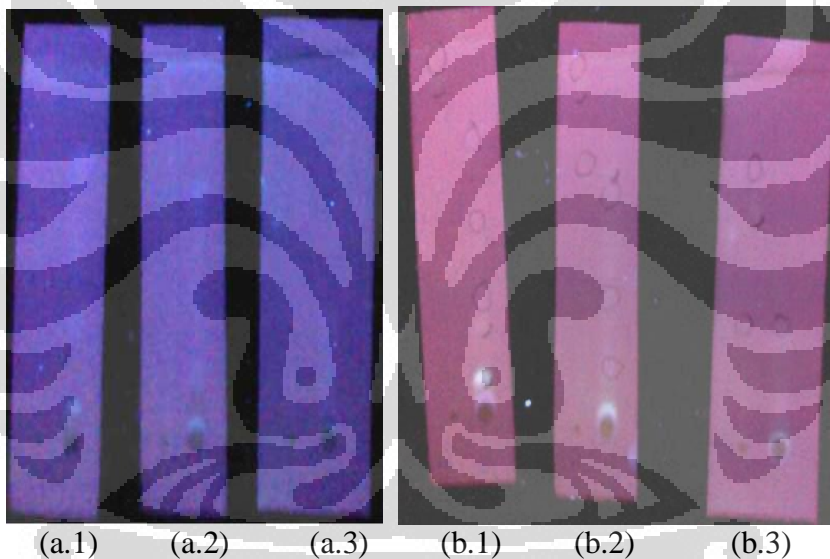
**Gambar 3.8.** Spektrofotometer UV-Vis



**Gambar 4.1.** *Terminalia catappa* L. (Pohon Ketapang)



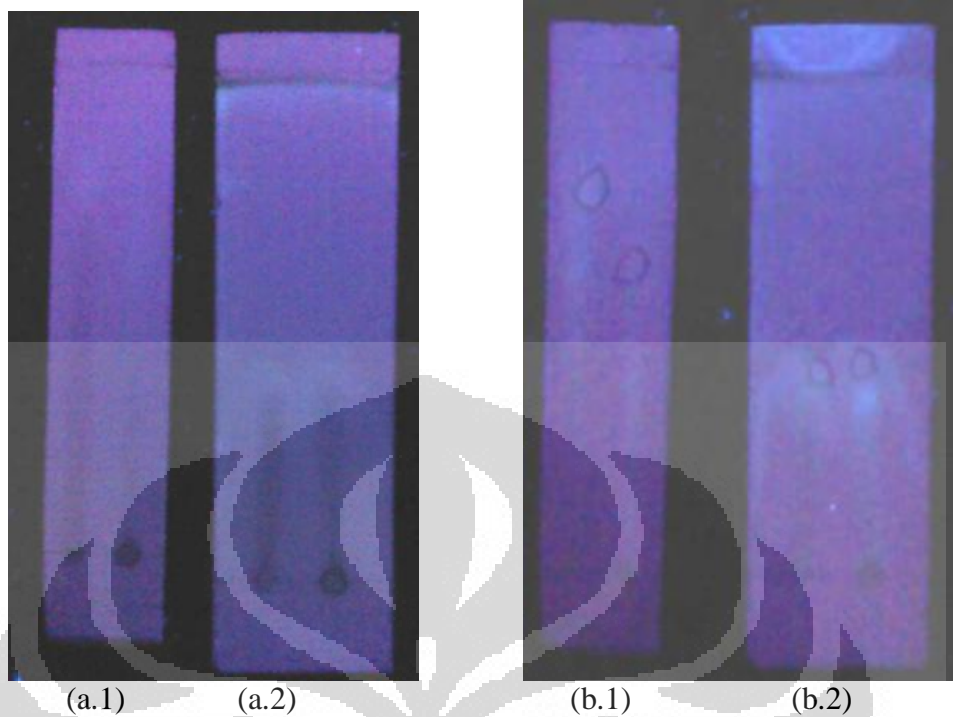
**Gambar 4.2.** *Terminalia catappa* L. (Daun dan Buah Ketapang)



Keterangan : (a.1) = berurutan dari kiri fraksi petroleum eter dan etil asetat dengan eluen heksan: etil asetat (6:4)  
 (a.2) = berurutan dari kiri fraksi petroleum eter dan etil asetat dengan eluen heksan: etil asetat (7:3)  
 (a.3) = berurutan dari kiri fraksi petroleum eter dan etil asetat dengan eluen heksan: etil asetat (8:2)  
 (b.1) = berurutan dari kiri fraksi petroleum eter dan etil asetat dengan eluen heksan: etil asetat (6:4)  
 (b.2) = berurutan dari kiri fraksi petroleum eter dan etil asetat dengan eluen heksan: etil asetat (7:3)  
 (b.3) = berurutan dari kiri fraksi petroleum eter dan etil asetat dengan eluen heksan: etil asetat (8:2)

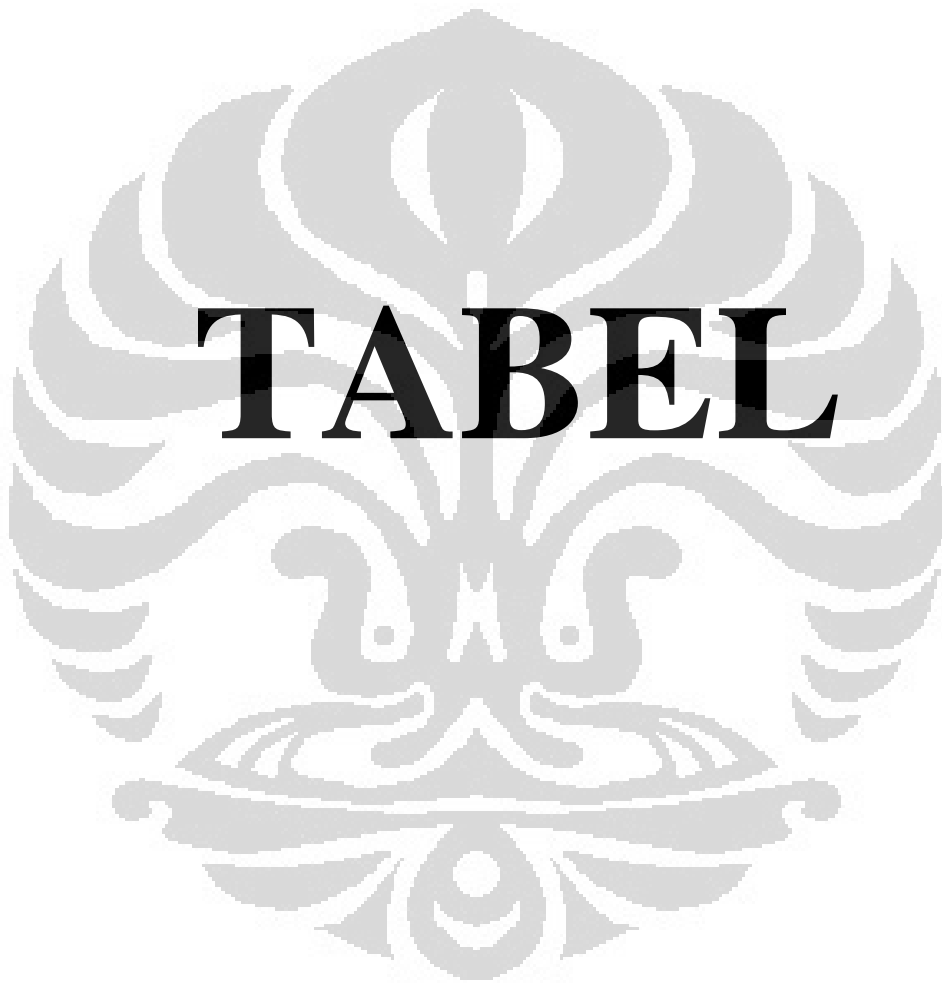
**Gambar 4.5.** Kromatogram Flavonoid Fraksi Petroleum Eter dan Etil Asetat dengan Eluen Heksan : Etil Asetat saat sebelum (a.1-a.3) dan sesudah (b.1-b.3) disemprot Larutan Penampak Noda  $AlCl_3$





Keterangan : (a.1) = berurutan dari kiri fraksi butanol dan metanol-air dengan eluen heksan: metanol (3:7)  
 (a.2) = berurutan dari kiri fraksi butanol dan metanol-air dengan eluen heksan: metanol (4:6)  
 (b.1) = berurutan dari kiri fraksi butanol dan metanol-air dengan eluen heksan: metanol (3:7)  
 (b.2) = berurutan dari kiri fraksi butanol dan metanol-air dengan eluen heksan: metanol (4:6)

**Gambar 4.6.** Kromatogram Flavonoid Fraksi Butanol dan Metanol-Air dengan Eluen Heksan : Metanol sebelum (a.1-a.2) dan sesudah (b.1-b.2) disempnot Larutan Penampak Noda  $AlCl_3$



**Tabel 4.1.** Susut Pengeringan Tanaman Uji

Nama Tanaman Uji	Sebelum dikeringkan (g)	Setelah dikeringkan (g)	Susut Pengeringan (%)
Buah Ketapang	6035	2300	61,89

**Tabel 4.2.** Rendemen Ekstrak Etanol Tanaman Uji

Nama Tanaman	Berat Simplisia (g)	Berat Ekstrak Kental (g)	Rendemen (%)
Buah Ketapang	1500,0315	135,1254	9,0082

**Tabel 4.3.** Berat Ekstrak Hasil Fraksinasi

Nama Fraksi	Berat (g)
Fraksi Petroleum Eter	24,4211
Fraksi Etil Asetat	12,3016
Fraksi Butanol	21,4500
Fraksi Metanol-Air	53,2785



**Tabel 4.4.** Pengujian Aktivitas Larutan Enzim 0,0279 U/mL

Konsentrasi Enzim	Konsentrasi Substrat	Dapar Fosfat		Serapan (A)		Serapan rata-rata	U-K	Aktivitas Enzim	
				A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>			U/mL	U/mg
0,0279 U/mL	10 mM	7,0	Uji (U)	0,578	0,589	0,5835	0,5015	0,2955	24,63
			Kontrol (K)	0,087	0,077	0,082			

Keterangan: A<sub>1</sub>= Serapan pertama; A<sub>2</sub>= Serapan kedua (duplo); U-K = Serapan uji-Serapan kontrol ; U/mL = Aktivitas enzim yang dinyatakan dalam Unit/mL; U/mg = Aktivitas enzim yang dinyatakan dalam Unit/mg

**Tabel 4.5.** Optimasi Aktivitas Enzim dengan Dapar Fosfat pH (6,0);(7,0);(7,2)

Konsentrasi Enzim	Konsentrasi Substrat	Dapar Fosfat		Serapan (A)		Serapan rata-rata
				A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	
0,0279U/mL	10 mM	6,8	Uji (U)	0,471	0,438	0,4545
			Kontrol (K)	0,061	0,061	0,061
		7,0	Uji (U)	0,578	0,589	0,5835
			Kontrol (K)	0,087	0,077	0,082
		7,2	Uji (U)	1,114	1,150	1,132
			Kontrol (K)	0,057	0,048	0,0525

Keterangan: A<sub>1</sub>= Serapan pertama; A<sub>2</sub>= Serapan kedua (duplo)

**Tabel 4.6.** Optimasi Aktivitas Enzim dengan Waktu Inkubasi 15; 20; 30 menit pada konsentrasi enzim 0,0279 U/mL, konsentrasi substrat 10 mM dan pH 7,0

Waktu Inkubasi		Serapan (A)		Serapan rata-rata
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	
15 menit	Uji (U)	0,578	0,589	0,5835
	Kontrol (K)	0,087	0,077	0,082
20 menit	Uji (U)	0,792	0,805	0,7985
	Kontrol (K)	0,019	0,015	0,017
30 menit	Uji (U)	1,346	1,177	1,2615
	Kontrol (K)	0,026	0,019	0,0225

Keterangan: A<sub>1</sub>= Serapan pertama; A<sub>2</sub>= Serapan kedua (duplo)

**Tabel 4.7.** Optimasi Aktivitas Enzim dengan Konsentrasi Substrat 0,625 mM; 1,25 mM; 2,5mM; 5 mM; 15 mM; 10 mM; 20 mM; 30 mM pada konsentrasi enzim 0,0279 U/mL, waktu inkubasi 15 menit dan pH 7,0

Konsentrasi Substrat		Serapan (A)		Serapan rata-rata	U-K	Aktivitas Enzim	
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>			U/mL	U/mg
0,625 mM	Uji (U)	0,242	0,249	0,2455	0,2345	0,1382	11,52
	Kontrol (K)	0,013	0,009	0,011			
1,25 mM	Uji (U)	0,307	0,322	0,3145	0,29	0,1709	14,24
	Kontrol (K)	0,029	0,020	0,0245			
2,5 mM	Uji (U)	0,422	0,448	0,435	0,4185	0,2466	20,55
	Kontrol (K)	0,016	0,017	0,0165			
5 mM	Uji (U)	0,519	0,496	0,5075	0,481	0,2835	23,62
	Kontrol (K)	0,024	0,029	0,0265			
10 mM	Uji (U)	0,578	0,589	0,5835	0,515	0,3035	25,29
	Kontrol (K)	0,060	0,077	0,0685			
15 mM	Uji (U)	0,720	0,685	0,7025	0,6515	0,3839	31,99
	Kontrol (K)	0,044	0,058	0,051			
20 mM	Uji (U)	0,645	0,647	0,646	0,577	0,34	28,34
	Kontrol (K)	0,071	0,067	0,069			
30 mM	Uji (U)	0,632	0,620	0,626	0,5075	0,2991	24,92
	Kontrol (K)	0,118	0,119	0,1185			

Keterangan: A<sub>1</sub>= Serapan pertama; A<sub>2</sub>= Serapan kedua (duplo); U-K = Serapan uji-Serapan kontrol ; U/mL = Aktivitas enzim yang dinyatakan dalam Unit/mL; U/mg = Aktivitas enzim yang dinyatakan dalam Unit/mg

**Tabel 4.8.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Akarbose (sebagai Pemanding)

Konsentrasi		Serapan (A)		Serapan rata-rata	S <sub>1</sub> -S <sub>0</sub>	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
1% (50,25 ppm)	S <sub>1</sub>	0,543	0,527	0,535	0,4535	13,7012	232,11
	S <sub>0</sub>	0,085	0,078	0,0815			
0,50% (25,125 ppm)	S <sub>1</sub>	0,562	0,534	0,548	0,473	9,9905	
	S <sub>0</sub>	0,073	0,077	0,075			
0,25% (12,5625 ppm)	S <sub>1</sub>	0,545	0,575	0,56	0,487	7,3264	
	S <sub>0</sub>	0,077	0,069	0,073			
0,125% (6,28125 ppm)	S <sub>1</sub>	0,580	0,584	0,582	0,502	4,4719	
	S <sub>0</sub>	0,083	0,077	0,080			
B (Blanko)					0,5255		
Persamaan regresi					y = 4,2279 + 0,1972 x		

Keterangan: A<sub>1</sub>= Serapan pertama; A<sub>2</sub>= Serapan kedua (duplo); S<sub>1</sub>= Sampel; S<sub>0</sub>= Kontrol Sampel; IC<sub>50</sub> = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

**Tabel 4.9.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Petroleum Eter

Konsentrasi		Serapan (A)		Serapan rata-rata	S <sub>1</sub> -S <sub>0</sub>	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
0,125% (6,25 ppm)	S <sub>1</sub>	0,285	0,357	0,321	0,2245	60,1243	4,52
	S <sub>0</sub>	0,094	0,099	0,0965			
0,0625% (3,125 ppm)	S <sub>1</sub>	0,460	0,428	0,444	0,293	47,9574	
	S <sub>0</sub>	0,143	0,159	0,151			
0,03125% (1,5625 ppm)	S <sub>1</sub>	0,569	0,589	0,579	0,409	27,3535	
	S <sub>0</sub>	0,206	0,134	0,170			
0,015625% (0,78125 ppm)	S <sub>1</sub>	0,594	0,600	0,597	0,506	10,1243	
	S <sub>0</sub>	0,185	0,197	0,191			
B (Blanko)					0,563		
Persamaan regresi					y = 11,3715 + 8,5396 x		

Keterangan: A<sub>1</sub>= Serapan pertama; A<sub>2</sub>= Serapan kedua (duplo); S<sub>1</sub>= Sampel; S<sub>0</sub>= Kontrol Sampel; IC<sub>50</sub> = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

**Tabel 4.10.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Etil Asetat

Konsentrasi		Serapan (A)		Serapan rata-rata	$S_1-S_0$	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
0,125% (6,3 ppm)	S <sub>1</sub>	0,325	0,444	0,3845	0,1205	79,0435	2,94
	S <sub>0</sub>	0,272	0,256	0,264			
0,0625% (3,15 ppm)	S <sub>1</sub>	0,387	0,426	0,4065	0,2865	50,1739	
	S <sub>0</sub>	0,118	0,122	0,120			
0,03125% (1,575 ppm)	S <sub>1</sub>	0,505	0,424	0,4645	0,3345	41,8261	
	S <sub>0</sub>	0,140	0,120	0,130			
0,015625% (0,7875 ppm)	S <sub>1</sub>	0,461	0,656	0,5585	0,4060	29,3913	
	S <sub>0</sub>	0,090	0,215	0,1525			
B (Blanko)					0,575		
Persamaan regresi					y = 24,7448 + 8,5888 x		

Keterangan: A<sub>1</sub>= Serapan pertama; A<sub>2</sub>= Serapan kedua (duplo); S<sub>1</sub>= Sampel; S<sub>0</sub>= Kontrol Sampel;  
IC<sub>50</sub> = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

**Tabel 4.11.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Butanol

Konsentrasi		Serapan (A)		Serapan rata-rata	$S_1-S_0$	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
0,125% (6,25 ppm)	S <sub>1</sub>	0,311	0,297	0,304	0,233	58,7611	5,00
	S <sub>0</sub>	0,012	0,130	0,071			
0,0625% (3,125 ppm)	S <sub>1</sub>	0,492	0,455	0,4735	0,3495	38,1416	
	S <sub>0</sub>	0,101	0,147	0,124			
0,03125% (1,5625 ppm)	S <sub>1</sub>	0,573	0,593	0,583	0,446	21,0619	
	S <sub>0</sub>	0,067	0,070	0,137			
0,015625% (0,78125 ppm)	S <sub>1</sub>	0,589	0,601	0,595	0,54	4,4248	
	S <sub>0</sub>	0,043	0,067	0,055			
B (Blanko)					0,565		
Persamaan regresi					y = 3,1743 + 9,3604 x		

Keterangan: A<sub>1</sub>= Serapan pertama; A<sub>2</sub>= Serapan kedua (duplo); S<sub>1</sub>= Sampel; S<sub>0</sub>= Kontrol Sampel;  
IC<sub>50</sub> = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

**Tabel 4.12.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Metanol-Air

Konsentrasi		Serapan (A)		Serapan rata-rata	S <sub>1</sub> -S <sub>0</sub>	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
0,125% (6,375 ppm)	S <sub>1</sub>	0,669	0,552	0,6105	0,4265	24,1103	14,03
	S <sub>0</sub>	0,176	0,192	0,184			
0,0625% (3,1875 ppm)	S <sub>1</sub>	0,627	0,651	0,639	0,5095	9,3416	
	S <sub>0</sub>	0,167	0,092	0,1295			
0,03125% (1,59375 ppm)	S <sub>1</sub>	0,642	0,660	0,651	0,5160	8,1850	
	S <sub>0</sub>	0,142	0,128	0,135			
0,015625% (0,796875 ppm)	S <sub>1</sub>	0,684	0,672	0,678	0,5410	3,7366	
	S <sub>0</sub>	0,132	0,142	0,137			
B (Blanko)					0,562		
Persamaan regresi					y = 0,8819 + 3,5008 x		

Keterangan: A<sub>1</sub>= Serapan pertama; A<sub>2</sub>= Serapan kedua (duplo); S<sub>1</sub>= Sampel; S<sub>0</sub>= Kontrol Sampel;  
 IC<sub>50</sub> = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

**Tabel 4.14.** Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Enzim Fraksi Teraktif/  
Etil Asetat

Konsentrasi Substrat [S]	Serapan (V)			1/[Substrat]	1/V <sub>0</sub>	1/V <sub>1</sub>	1/V <sub>2</sub>
	V <sub>0</sub>	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>				
20 mM	0,676	0,538	0,595	0,05	1,4793	1,8587	1,6807
15 mM	0,682	0,630	0,607	0,0667	1,4663	1,5873	1,6474
10 mM	0,665	0,613	0,594	0,1	1,5038	1,6313	1,6835
5 mM	0,656	0,585	0,558	0,2	1,5244	1,7094	1,7921

Keterangan : V<sub>0</sub> = Tanpa inhibitor; V<sub>1</sub> = inhibitor 0,7875 ppm; V<sub>2</sub> = inhibitor 1,575 ppm

**Tabel 4.14.** Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Enzim Fraksi Teraktif  
/Etil Asetat (lanjutan)

Konsentrasi Substrat [S]	Serapan (V)			1/[Substrat]	1/V <sub>0</sub>	1/V <sub>3</sub>	1/V <sub>4</sub>
	V <sub>0</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>				
20 mM	0,676	0,521	0,603	0,05	1,4793	1,9194	1,6584
15 mM	0,682	0,590	0,533	0,0667	1,4663	1,6949	1,8762
10 mM	0,665	0,539	0,491	0,1	1,5038	1,8553	2,0367
5 mM	0,656	0,529	0,408	0,2	1,5244	1,8904	2,4510

Keterangan : V<sub>0</sub> = Tanpa inhibitor; V<sub>3</sub> = inhibitor 3,15 ppm; V<sub>4</sub> = inhibitor 6,3 ppm

**Tabel 4.15.** Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten Fraksi Etil Asetat 6,3 ppm

	a	b	V <sub>max</sub>	K <sub>m</sub>
Tanpa inhibitor	1,4572	0,3476	0,69	0,24
Inhibitor 6,3 ppm	1,4961	4,8902	0,67	3,27

**Tabel 4.17.** Hasil Perhitungan Harga Rf Fraksi Petroleum Eter dan Etil Asetat

Eluen Heksan : Etil Asetat	Harga Rf	
	Fraksi Petroleum Eter	Fraksi Etil Asetat
6:4	0,96; 0,88	0,74; 0,53; 0,33; 0,24; 0,09
7:3	0,98 ; 0,89; 0,72	0,68; 0,64; 0,36; 0,18
8:2	0,74; 0,6; 0,34	0,34

**Tabel 4.18.** Hasil Perhitungan Harga Rf Fraksi Butanol dan Metanol-Air

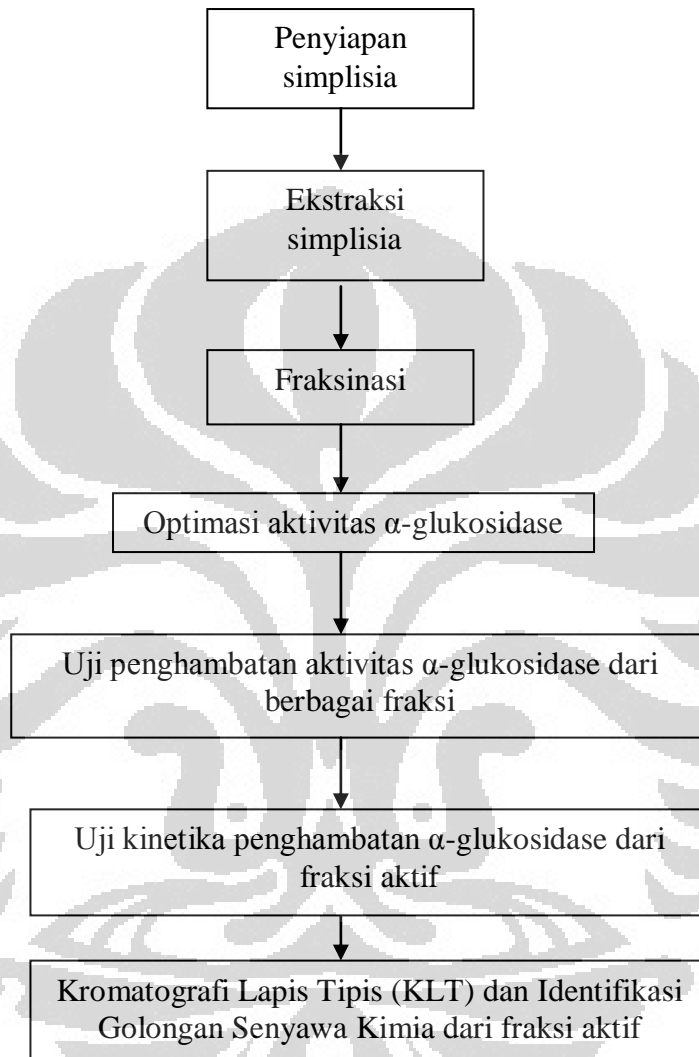
Eluen Heksan : Metanol	Harga Rf	
	Fraksi Butanol	Fraksi Metanol-Air
3:7	0,76; 0,74	0,63; 0,38
4:6	0,41; 0,35	0,43; 0,35



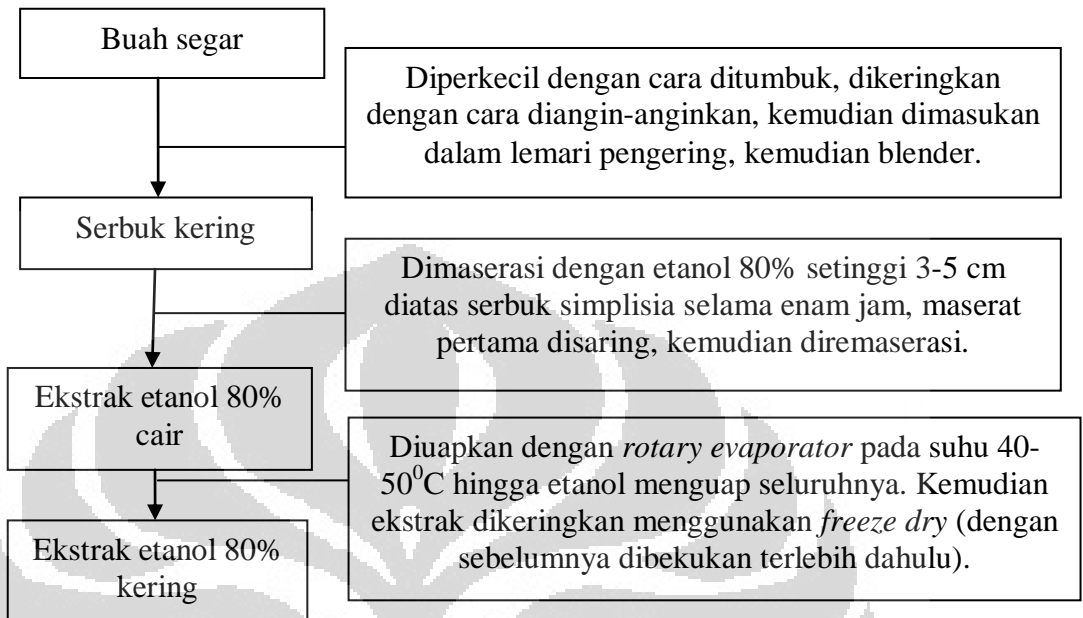
# LAMPIRAN



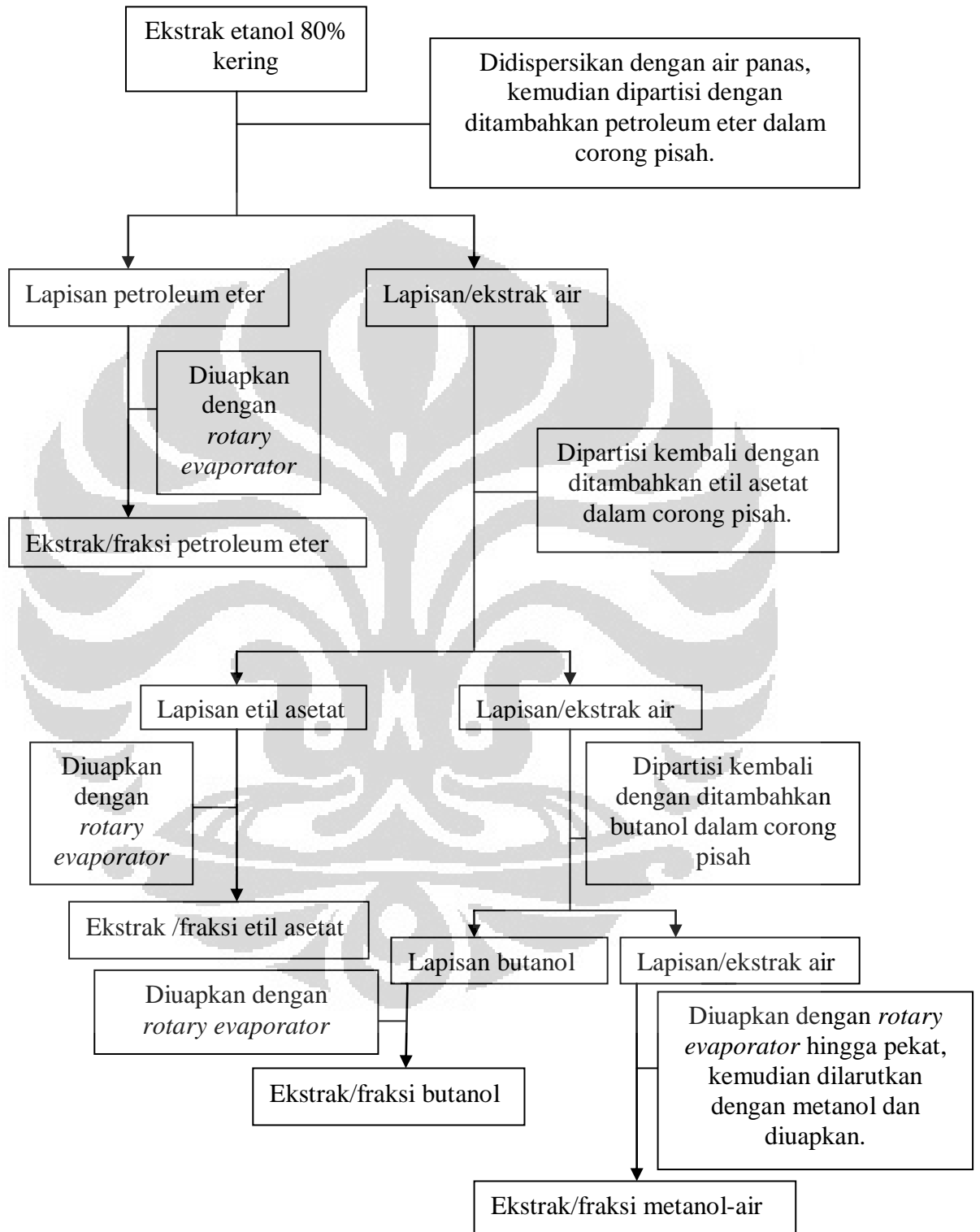
**Lampiran 1.** Skema Kerja Prosedur Pelaksanaan



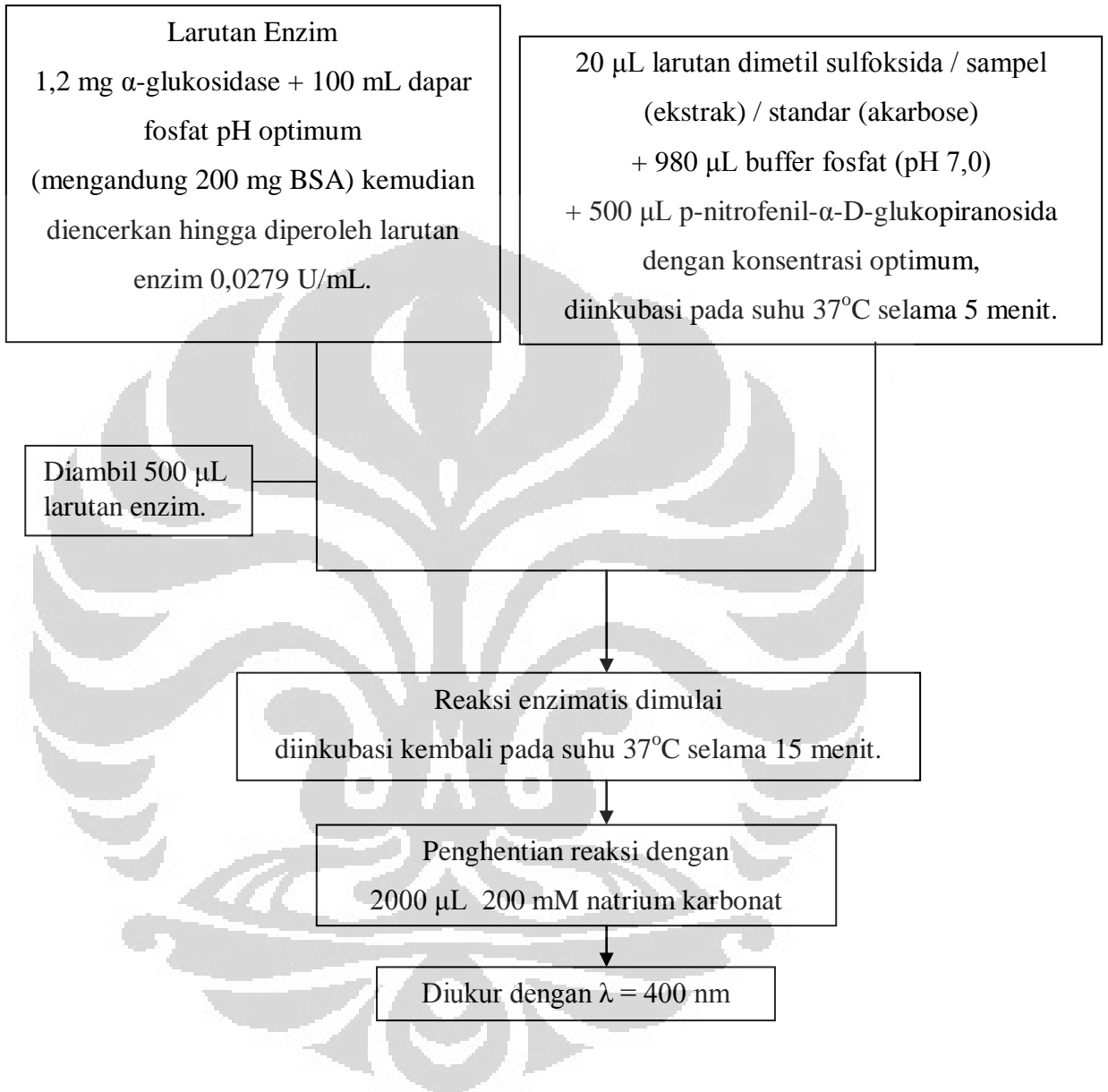
## Lampiran 2. Skema Persiapan Sampel dan Ekstraksi



### Lampiran 3. Skema Fraksinasi



**Lampiran 4.** Skema Uji Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -glukosidase



## Lampiran 5. Cara Perhitungan Unit Larutan $\alpha$ -Glukosidase

Label yang terdapat pada kemasan  $\alpha$ -glukosidase adalah 16,5 mg; 26 % protein; 179 Unit/mg protein.

$$\text{Jumlah protein} = \frac{26}{100} \times 16,5 \text{ mg serbuk} = 4,29 \text{ mg protein.}$$

Perbandingan jumlah protein dengan total massa serbuk

$$\frac{4,29 \text{ mg protein}}{16,5 \text{ mg serbuk}} = \frac{1 \text{ mg protein}}{3,85 \text{ mg serbuk}} \rightarrow 1 \text{ mg protein} \sim 3,85 \text{ mg serbuk}$$

$\sim 179 \text{ unit}$

$$\frac{16,5 \text{ mg serbuk}}{3,85 \text{ mg serbuk}} \times 179 \text{ Unit} = 767,14 \text{ Unit}$$

Jadi, dalam 1 kemasan  $\alpha$ -glukosidase mengandung 767,14 Unit.

Pada penelitian sebelumnya, ternyata larutan enzim 5,58 Unit menghasilkan serapan yang tinggi. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan target larutan enzim 2,79 Unit, dengan volume larutan enzim 100 mL.

$$\frac{2,79 \text{ Unit}}{179 \text{ Unit}} \times 767,14 \text{ Unit} = 11,85 \text{ mg serbuk}$$

Dikarenakan 11,85 mg terlalu kecil untuk ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik yang memiliki kemampuan menimbang minimum 1,00 mg, maka dilakukan penimbangan  $\pm 1,00 \text{ mg}$  serbuk enzim, dan diperoleh hasil penimbangan sejumlah 1,20 mg serbuk enzim.

### Penimbangan enzim untuk pengujian sejumlah 1,20 mg serbuk enzim

$$\frac{1,20 \text{ mg serbuk}}{3,85 \text{ mg serbuk}} \times 179 \text{ Unit} = 55,7922 \text{ Unit}$$

$$\frac{55,7922 \text{ Unit}}{100 \text{ mL}} = 0,5579 \text{ Unit / mL}$$

Berdasarkan perhitungan di atas, larutan induk 0,5579 Unit/mL dapat dibuat dengan cara melarutkan 1,20 mg  $\alpha$ -glukosidase dengan larutan BSA dengan berbagai pH (6,8); (7,0); (7,2) secukupnya hingga 100,0 mL.

**Untuk memperoleh larutan enzim 0,0279 U/mL, diperlukan 2 kali pengenceran larutan induk 0,5579 U/mL.**

Pengenceran pertama, diambil 5,0 ml larutan enzim dan dilarutkan dengan dapar fosfat berbagai pH (6,8); (7,0); (7,2) hingga volume 10,0 mL.

$$\frac{5,0 \text{ mL}}{10,0 \text{ mL}} \times 0,5579 \frac{\text{U}}{\text{mL}} = 0,27895 \frac{\text{U}}{\text{mL}}$$

Pengenceran kedua, diambil 1,0 mL larutan enzim dan dilarutkan dengan dapar fosfat berbagai pH (6,8); (7,0); (7,2) hingga volume 10,0 mL.

$$\frac{1,0 \text{ mL}}{10,0 \text{ mL}} \times 0,27895 \frac{\text{U}}{\text{mL}} = 0,0279 \frac{\text{U}}{\text{mL}}$$

(unit enzim yang digunakan untuk uji aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase).

Lampiran 6. Surat Determinasi 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) 87907638 - 87907604 Fax. 87907812

Cibinong, 27 Juli 2011

Nomor : III/IPH.1.02/IF.8/VII/2011  
Lampiran : -  
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.  
Bpk./Ibu/Sdr(t), Devi Sofawati  
NPM : 0806453535  
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	Buku
1	ketupang	<i>Terminalia catappa</i> L.	Combrataceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani  
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

Dr. Jochi Setiyo Raharjo  
NIP. 196705241993032004

Lampiran 7. Sertifikat Analisis  $\alpha$ -Glukosidase

# Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

**Product Name**  $\alpha$ -Glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*, recombinant, expressed in unspecified host, lyophilized powder,  $\geq 125$  units/mg protein  
**Product Number** G0660  
**Product Brand** SIGMA  
**CAS Number** 9001-42-7

**TEST**

% Protein (Biuret)  
units/mg protein

**SPECIFICATION**

$\geq 10$   
 $\geq 125$   
One unit will liberate 1.0 micromole of D-Glucose from P-Nitrophenyl Alpha-D-Glucoside per minute at pH 6.8 at 37 deg C.  
 $\geq 50$   
One unit will convert 1.0 micromole of Maltose to 2.0 micromoles of D-Glucose per minute at pH 6.0 at 25 deg C.

**LOT 129K1426 RESULTS**

26  
179

units/mg protein

114

**Recommended Retest Period**

4 years

**Specification Date:**

APR 2009

**Date of QC Release:**

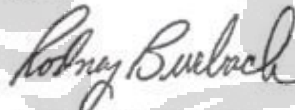
JAN 2010

**Recommended Retest Date:**

DEC 2013

**Print Date:**

JAN 25 2010



Rodney Burbach, Manager  
Quality Control  
St. Louis, Missouri USA