



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS  $\alpha$ -GLUKOSIDASE DAN  
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA DARI FRAKSI  
YANG AKTIF PADA EKSTRAK KULIT BATANG  
*Cinnamomum burmannii* (Nees & T.Nees) Blume**

**SKRIPSI**

**RIZA APRIANI  
0906601613**

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



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS  $\alpha$ -GLUKOSIDASE DAN  
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA DARI FRAKSI  
YANG AKTIF PADA EKSTRAK KULIT BATANG  
*Cinnamomum burmannii* (Nees & T.Nees) Blume**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
sarjana farmasi**

**RIZA APRIANI  
0906601613**

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

ii

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

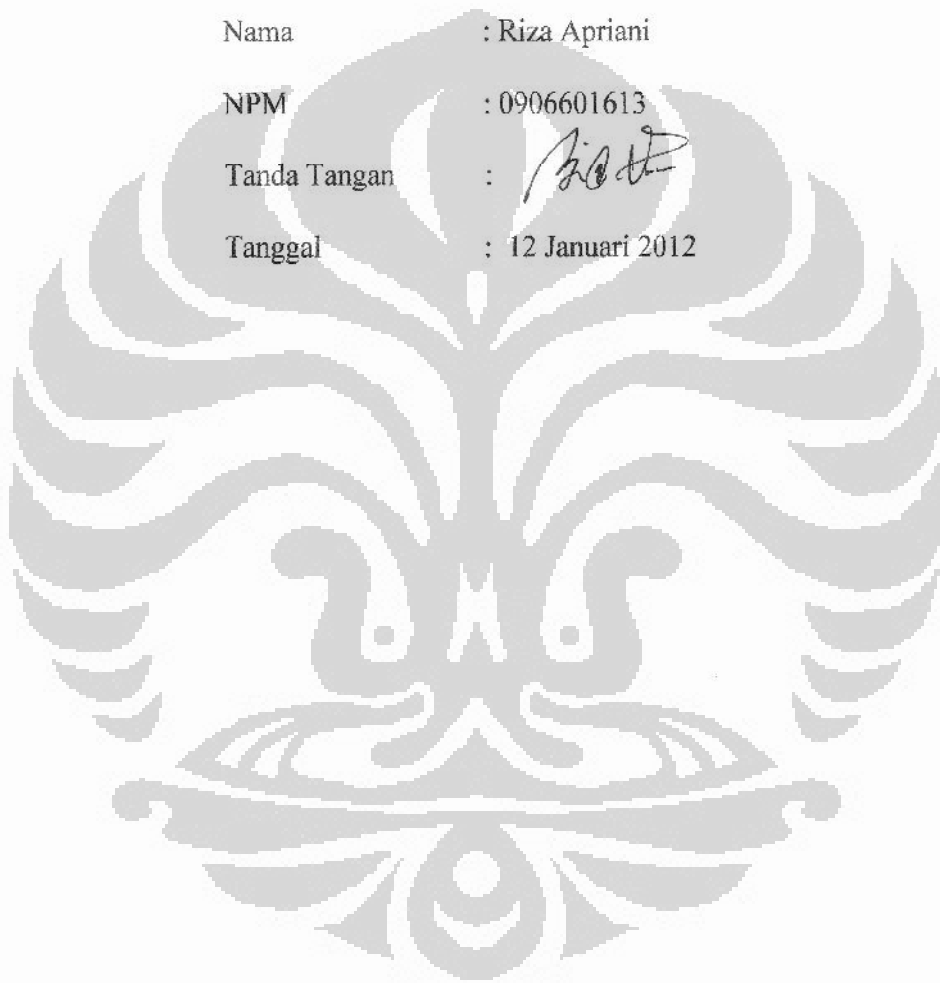
Skripsi ini adalah karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Riza Apriani

NPM : 0906601613

Tanda Tangan : 

Tanggal : 12 Januari 2012



## HALAMAN PENGESAHAN


Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Riza Apriani  
NPM : 0906601613  
Program Studi : Ekstensi Farmasi  
Judul Skripsi : Uji Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi yang Aktif pada Ekstrak Kulit Batang *Cinnamomum burmannii* (Nees & T.Nees) Blume

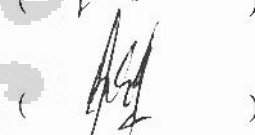
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Ekstensi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Katrin, M.S. (  )

Pembimbing II : Dr. Abdul Mun'im, M.Si (  )

Penguji I : Dr. Anton B, M.Biomed (  )

Penguji II : Dr. Arry yanuar, M.S. (  )

Penguji III : Drs. jahja Atmadja (  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 19 januari 2012

## KATA PENGANTAR

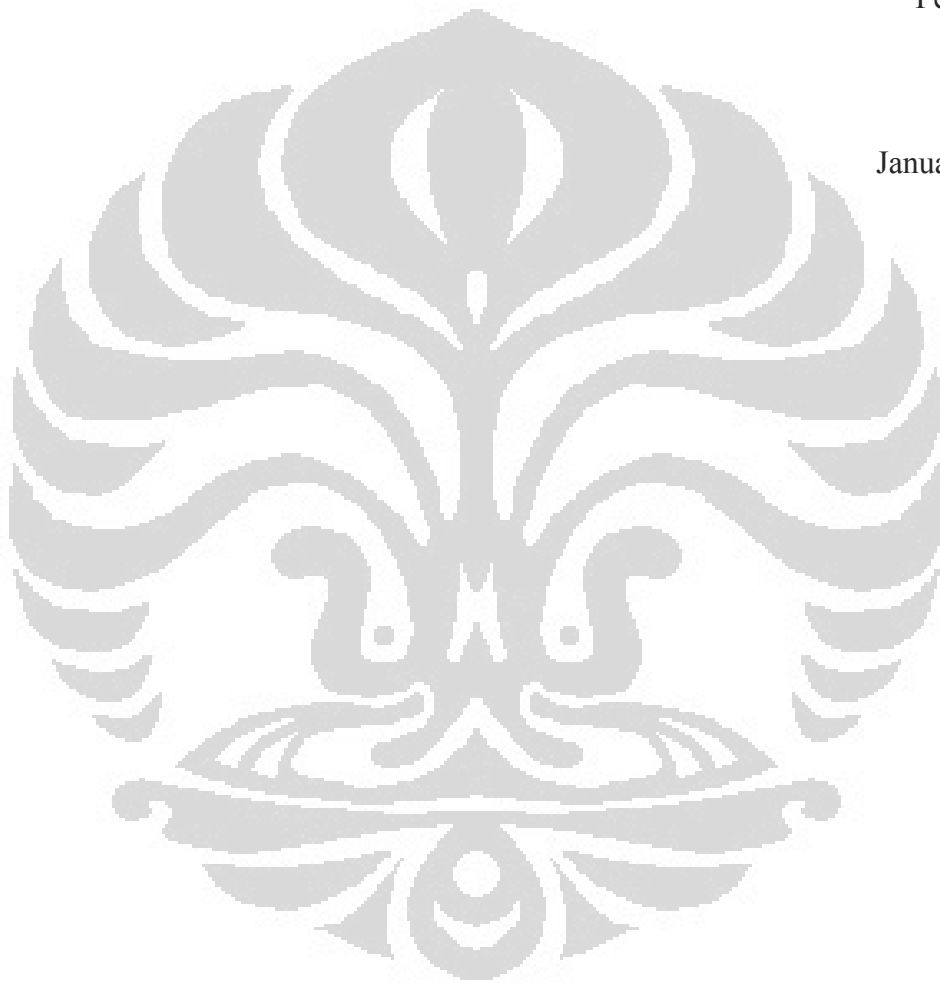
Alhamdulillah segala puji dan syukur saya persembahkan kehadirat Allah SWT, karena berkat rahmat dan karunia-Nya penulisan skripsi ini dapat diselesaikan dengan waktu yang telah ditentukan. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan serta dorongan dari berbagai pihak yang telah banyak membantu. Oleh karena itu, saya mengucapkan rasa terima kasih kepada :

- (1) Dr. Katrin, M.S., Apt dan Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt selaku pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya selama proses penelitian hingga penyusunan skripsi ini.
- (2) Dra. Maryati Kurniadi, M.Si., Apt selaku pembimbing akademis yang telah membimbing saya selama mengikuti perkuliahan di farmasi.
- (3) Prof. Dr. Yahdiana Harahap selaku ketua departemen yang telah membimbing dan membantu selama mengikuti perkuliahan di farmasi.
- (4) Dra. Azizahwati, M.S., Apt selaku ketua program ekstensi Departemen Farmasi FMIPA UI atas pengarahan yang diberikan dalam penyusunan skripsi ini.
- (5) Pihak Balitro dan LIPI Cibinong yang telah membantu dalam pengadaan bahan baku tanaman serta determinasi tanaman.
- (6) Seluruh staff dan dewan pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas bantuan dan bimbingannya selama mengikuti perkuliahan.
- (7) Kedua orang tua dan kakak yang sangat saya cintai serta seluruh keluarga yang telah memberi dukungan material dan moral.
- (8) Sahabat-sahabat yang telah memberi semangat dalam menjalani masa-masa perkuliahan serta teman-teman seperjuangan di Fitokimia yang telah membantu dan berkerja bersama-sama selama penelitian

Semoga kebaikan mereka mendapat balasan berlipat dari Allah SWT. Saya menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan dalam skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak demi penyempurnaan skripsi ini. Akhir kata, saya berharap semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

Januari 2012



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

---

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

Nama : Riza Apriani

NPM : 0906601613

Program Studi : Ekstensi

Departemen : Farmasi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Jenis karya : Skripsi

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

“Uji Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi yang Aktif pada Ekstak Kulit Batang *Cinnamomum burmannii* (Nees & T.Ness) Blume.”

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 12 Januari 2012

Yang menyatakan



( Riza Apriani )

## ABSTRAK

Nama : Riza Apriani  
Program studi : Ekstensi Farmasi  
Judul : Uji Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi yang Aktif pada Ekstrak Kulit Batang *Cinnamomum burmannii* (Nees & T.Nees) Blume

Diabetes mellitus atau penyakit gula darah adalah salah satu penyakit yang cukup menonjol di antara penyakit-penyakit lain seperti penyakit jantung dan pembuluh darah, serta penyakit kanker. Pengobatan diabetes melitus dapat dilakukan dengan pemberian Insulin, obat hipoglikemik oral, dan obat herbal. Salah satu tanaman obat yang bisa dijadikan sebagai obat herbal untuk penyakit diabetes melitus adalah kayu manis. Berdasarkan penelitian sebelumnya, kayu manis memiliki penghambatan terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase, namun senyawa aktif tidak diketahui kepolarannya, sehingga dilakukan fraksinasi untuk mengidentifikasi golongan senyawa dari fraksi yang aktif. Pengujian dilakukan secara *in vitro* terhadap ekstrak petroleum eter, etil asetat, n-butanol dan air menggunakan  $\alpha$ -glukosidase dan substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida yang menghasilkan produk paranitrofenol. Produk tersebut diukur serapannya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  400 nm. Parameter adanya aktivitas penghambatan yang dimiliki oleh ekstrak ditunjukkan oleh nilai %inhibisi dan  $IC_{50}$ . Hasil uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase menunjukkan bahwa ke empat fraksi ekstrak kulit batang kayu manis menunjukkan aktivitas penghambatan. Fraksi ekstrak yang memiliki penghambatan terbaik terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase adalah ekstrak n-butanol dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 1,168  $\mu$ g/mL.  $IC_{50}$  ekstrak etil asetat, air dan petroleum eter adalah 19,239  $\mu$ g/mL, 24,244  $\mu$ g/mL, dan 69,717  $\mu$ g/mL. Golongan senyawa yang dikandung oleh ekstrak n-butanol adalah flavonoid, glikosida dan tanin.

Kata Kunci : Penghambat  $\alpha$ -glukosidase, kayu manis, identifikasi golongan senyawa

xiv + 88 halaman : 18 gambar, 29 tabel, 6 lampiran

Daftar referensi : 61 (1977-2011)



## ABSTRACT

Name : Riza Apriani  
Program study : Pharmacy Extention  
Title : Inhibition Test of  $\alpha$ -Glucosidase Activity and Identification of Compounds from Active Fraction in Extract of *Cinnamomum burmannii* (Nees & T. Nees) Blume Bark

Diabetes mellitus or blood sugar disease is a quite prominent disease among other diseases such as heart and blood vessel, and cancer. Treatment of diabetes mellitus can be done by administering insulin, oral hypoglycemic drugs, and herbal medicine. One of the medicinal plants that could be used as herbal medicine for diabetes mellitus is cinnamon. Based on previous studies, cinnamon has inhibitory activity against  $\alpha$ -glucosidase, but the polarity of active compound is unknown, so that fractionation is done to identify the compound of the active fraction. The method was an in vitro model to extract of petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol and water using  $\alpha$ - glucosidase and substrate of p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside that produced p-nitrophenol. The product was measured by spectrophotometer UV-Vis at  $\lambda$  400 nm. The parameters of inhibitory activity of extracts is shown by the values of % inhibition and  $IC_{50}$ . The test results of inhibitory activity of  $\alpha$ -glucosidase showed that the four fractions of cinnamon bark extract, showed inhibitory activity. The extract fraction that have the best inhibitory activity against  $\alpha$ -glucosidase is n-butanol extract with  $IC_{50}$  values of 1.168 mg/mL.  $IC_{50}$  values of ethyl acetate, water and petroleum ether extract is 19.239  $\mu$ /ml, 24.244  $\mu$ /mL, and 69.717  $\mu$ / mL. The compounds contained by n-butanol extract are flavonoids, glycosides and tannins.

Key Words :  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, cinnamon, phytochemical screening

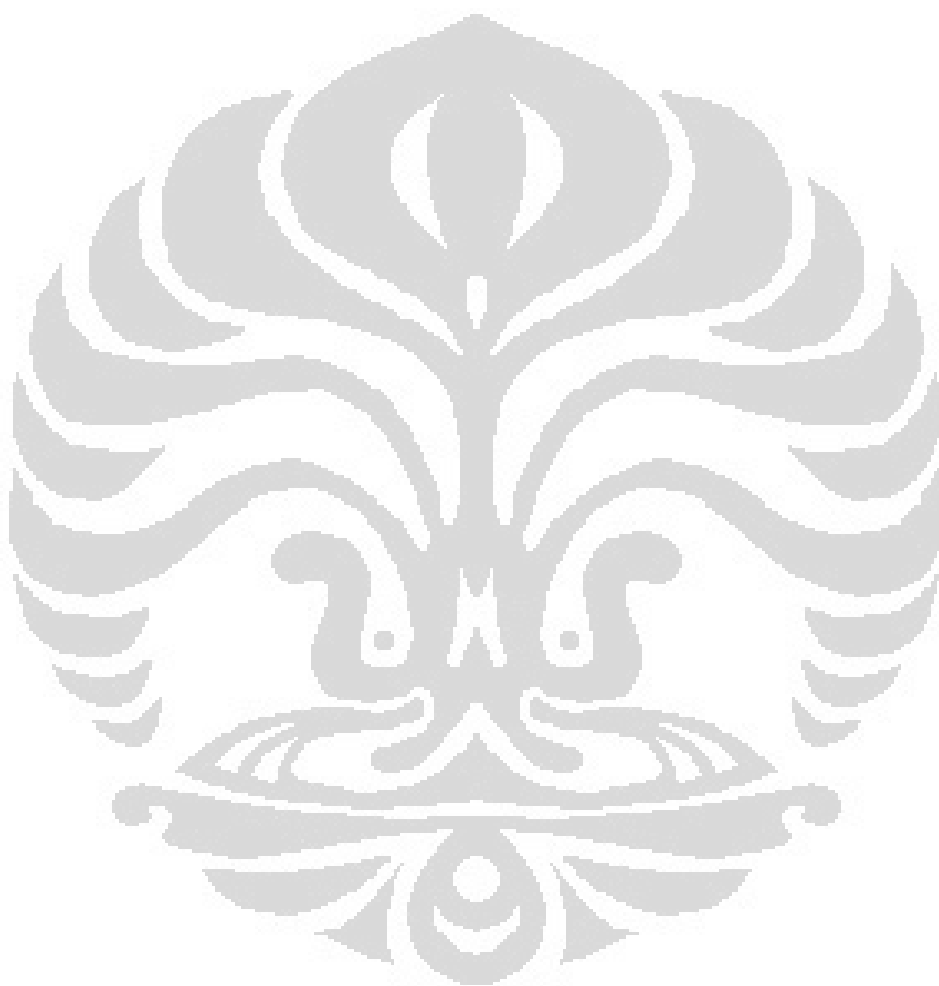
xiv + 88 pages : 18 pictures, 29 tables, 6 appendixes

Bibliography : 61 (1977-2011)

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan Penelitian .....	2
1.3. Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1. Tanaman Kayu Manis .....	4
2.2. Simplisia .....	7
2.3. Ekstrak dan Ekstraksi .....	7
2.4. Fraksinasi .....	9
2.5. Penapisan Fitokimia .....	9
2.6. Kromatografi Lapis Tipis .....	12
2.7. Diabetes Mellitus .....	13
2.8. Antidiabetes Oral .....	15
2.9. Enzim .....	17
2.10. Mekanisme Penghambatan Aktivitas Enzim .....	19
2.11. Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim .....	21
2.12. Uji Inhibisi $\alpha$ -Glukosidase .....	24
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>26</b>
3.1. Waktu dan Tempat .....	26
3.2. Bahan .....	26
3.3. Alat .....	26
3.4. Prosedur Kerja .....	27
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>39</b>
4.1. Penyiapan Bahan .....	39
4.2. Ekstraksi dan Fraksinasi .....	40
4.3. Uji Pendahuluan Kondisi Optimum .....	42

4.4. Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase.....	46
4.5. Uji Kinetika Enzim .....	48
4.6. Identifikasi Golongan Senyawa .....	50
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>59</b>
5.1. Kesimpulan .....	59
5.2. Saran .....	59
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>60</b>



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1.	Rumus struktur polimer tipe-A polifenol..... 6
Gambar 2.2.	Tempat aksi obat pada pengobatan diabetes ..... 15
Gambar 2.3.	Struktur kimia akardiose ..... 17
Gambar 2.4.	Struktur kimia miglitol..... 17
Gambar 2.5.	Grafik persamaan <i>Lineweaver-Burk</i> ..... 21
Gambar 2.6.	Grafik persamaan <i>Lineweaver-Burk</i> pada penghambatan kompetitif..... 22
Gambar 2.7.	Grafik persamaan <i>Lineweaver-Burk</i> pada penghambatan nonkompetitif..... 23
Gambar 2.8.	Grafik persamaan <i>Lineweaver-Burk</i> pada penghambatan kompetitif campuran ..... 23
Gambar 2.9.	Grafik persamaan <i>Lineweaver-Burk</i> pada penghambatan unkompetitif..... 24
Gambar 2.10.	Persamaan reaksi enzimatik $\alpha$ -glukosidase dan p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida..... 24
Gambar 4.1.	Kurva hasil uji optimasi konsentrasi substrat ..... 46
Gambar 4.2.	Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> pada uji kinetika..... 49
Gambar 4.3.	Hasil KLT senyawa terpen pada ekstrak petroleum eter dengan eluen benzen-kloroform (3:7)..... 51
Gambar 4.4.	Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak etil asetat dengan eluen heksan-etil asetat (7:3)..... 54
Gambar 4.5.	Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak n-Butanol dengan eluen n-butanol-asam asetat-air (4 : 1: 5)..... 54
Gambar 4.6.	Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak air dengan eluen n-butanol-asam asetat-air (4 : 1: 5)..... 55
Gambar 4.7.	Pohon kayu manis ( <i>Cinnamomum burmannii</i> Blume)..... 67
Gambar 4.8.	Rajangan kulit batang kayu manis ..... 67

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1.	Sistem reaksi uji penghambatan $\alpha$ -glukosidase ..... 33
Tabel 4.1.	Nilai % susut pengeringan ..... 40
Tabel 4.2.	Bobot ekstrak kering dan nilai % rendemen ..... 41
Tabel 4.3.	Hasil fraksinasi serbuk <i>C. burmannii</i> Bl..... 42
Tabel 4.4.	Nilai IC <sub>50</sub> larutan uji..... 47
Tabel 4.5.	Nilai tetapan <i>Michaelis Menten</i> ..... 49
Tabel 4.6.	Hasil KLT senyawa terpen pada ekstrak petroleum eter dengan eluen benzene-kloroform (3:7)..... 51
Tabel 4.7.	Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak etil asetat dengan eluen heksan-etil asetat (7:3)..... 55
Tabel 4.8.	Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak n-butanol dengan eluen n-butanol-asam asetat-air (4 : 1: 5)..... 55
Tabel 4.8.	Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak air dengan eluen n-butanol-asam asetat-air (4 : 1: 5)..... 56
Tabel 4.10.	Kesimpulan hasil identifikasi golongan senyawa ..... 57
Tabel 4.11.	Data nilai aktivitas enzim pada uji optimasi pH ..... 69
Tabel 4.12.	Data nilai aktivitas enzim pada uji optimasi waktu inkubasi..... 69
Tabel 4.13.	Data nilai aktivitas enzim pada uji optimasi konsentrasi substrat.... 70
Tabel 4.14.	Aktivitas penghambatan akarbose ..... 71
Tabel 4.15.	Aktivitas penghambatan fraksi ekstrak petroleum eter..... 72
Tabel 4.16.	Aktivitas penghambatan fraksi ekstrak etil asetat..... 72
Tabel 4.17.	Aktivitas penghambatan fraksi ekstrak n-butanol..... 73
Tabel 4.18.	Aktivitas penghambatan fraksi ekstrak air..... 73
Tabel 4.19.	Serapan blangko kinetika inhibisi enzim ..... 74
Tabel 4.20.	Serapan sampel kinetika inhibisi enzim..... 75
Tabel 4.21.	Data 1/S dan 1/V kinetika inhibisi enzim ..... 75
Tabel 4.22.	Hasil identifikasi golongan terpen ..... 76
Tabel 4.23.	Hasil identifikasi golongan alkaloid ..... 76
Tabel 4.24.	Hasil identifikasi golongan saponin..... 77
Tabel 4.25.	Hasil identifikasi golongan flavonoid..... 77
Tabel 4.26.	Hasil identifikasi golongan glikosida..... 78
Tabel 4.27.	Hasil identifikasi golongan antraquinon ..... 78
Tabel 4.28.	Hasil identifikasi golongan tanin ..... 78

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Bagan tahapan penelitian .....	80
Lampiran 2. Uji penghambatan aktivitas $\alpha$ -glukosidase .....	81
Lampiran 3. Surat determinasi .....	82
Lampiran 4. Perhitungan enzim .....	83
Lampiran 5. Perhitungan konsentrasi larutan ekstrak .....	84
Lampiran 6. Data perhitungan Rf .....	87



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus atau penyakit gula darah adalah salah satu penyakit yang cukup menonjol di antara penyakit-penyakit lain seperti penyakit jantung dan pembuluh darah, serta penyakit kanker. Penyakit mengerikan ini ditemukan di semua belahan dunia dan menjadi ancaman serius bagi kesehatan manusia. Saat ini, diabetes melitus telah menjadi epidemi dengan kejadian di seluruh dunia sekitar 5% dari semua populasi (Jarald, Joshi, dan Jain, 2008). Menurut WHO, prevalensi penyakit ini akan tumbuh dari 171 juta pada tahun 2000 menjadi 366 juta di tahun 2030 (Cetto, Jimenez, dan Vazquez, 2007). Indonesia berada di urutan ke-4 setelah negara India, China dan Amerika dengan jumlah diabetesi sebesar 8,4 juta orang dan diperkirakan akan terus meningkat hingga 21,3 juta orang di tahun 2030 (Depkes, 2010).

Diabetes melitus merupakan sindrom klinis yang ditandai dengan hiperglikemia akibat kekurangan hormon insulin baik absolut maupun relatif (Wadkar *et al.*, 2008). Jika kadar gula darah terus meningkat sehingga tidak terkontrol, lama kelamaan akan timbul komplikasi. Komplikasi tersebut meliputi komplikasi mikrovaskuler (retinopati, neuropati, nefropati) dan komplikasi makrovaskular (serangan jantung, stroke dan penyakit pembuluh darah perifer) (Jarald, Joshi, dan Jain, 2008).

Untuk memperkecil risiko makin parahnya penyakit dan menurunkan risiko komplikasi diabetes melitus, diperlukan penanganan secara disiplin yang mencakup terapi non-obat dan terapi obat (Dirjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2005). Pengobatan diabetes melitus dapat dilakukan dengan pemberian insulin, obat hipoglikemik oral, dan obat herbal (Wadkar *et al.*, 2007). Mekanisme kerja obat hipoglikemik oral antara lain melalui perangsangan sekresi insulin, sensitiser insulin dan penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase (Hongxiang, Tang dan Liang, 2009). Obat-obat kimia selain harganya mahal biasanya mempunyai efek samping yang merugikan kesehatan. Sejak 1997, WHO

merencanakan program hidup sehat melalui *back to nature* (Setiadi dan Sarwono, 2007).

Indonesia memiliki banyak tanaman yang diduga berkhasiat sebagai bahan obat, termasuk obat diabetes melitus dan telah digunakan secara turun-temurun karena selain efek sampingnya relatif kecil juga harga lebih ekonomis. Banyaknya tanaman yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat Indonesia sebagai obat diabetes, menyebabkan perlunya dilakukan pengujian terhadap aktivitas antidiabetes. Salah satu tanaman obat yang bisa dijadikan sebagai obat herbal untuk penyakit diabetes melitus adalah kayu manis (Hongxiang, Tang dan Liang, 2009).

Tanaman kayu manis termasuk famili *Lauraceae* dengan jumlah spesies yang beragam dan dapat tumbuh dengan baik pada iklim tropis. Jenis kayu manis asal Indonesia adalah *Cinnamomum burmannii* (Nees & T.Nees) Blume yang sudah lama dikenal masyarakat sebagai rempah-rempah, serta secara tradisional dapat digunakan untuk meringankan penyakit pada penderita diabetes (BPOM, 2009). Penelitian tentang *C. burmannii* sebagai antidiabetes telah dilakukan oleh Mauldina (2011) melalui ekstraksi menggunakan metode refluks dengan pelarut etanol 80% yang dapat menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan nilai  $IC_{50}$  2,11  $\mu$ g/mL. Namun pada penelitian tersebut, senyawa aktif sebagai penghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tidak diketahui sifatnya kepolarannya.

Berdasarkan hal tersebut akan dilakukan penelitian tentang uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dan identifikasi golongan senyawa dari fraksi yang aktif pada ekstrak kulit batang *C. burmannii* berdasarkan perbedaan kepolaran penjarinya.

## 1.2 Tujuan Penelitian

### a. Tujuan jangka pendek

Tujuan jangka pendek penelitian ini adalah untuk mengetahui penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dari ekstrak kulit batang *C. burmannii* yang dihitung dari nilai  $IC_{50}$  dalam tiap fraksi petroleum eter, etil asetat, n-butanol, dan air serta mengidentifikasi golongan senyawa dari fraksi yang aktif pada ekstrak kulit batang *C. burmannii*.



**b. Tujuan jangka panjang**

Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah untuk memperoleh senyawa aktif yang diketahui identitas dan sifat fisiko kimianya serta menjadi rujukan pada penelitian tahap selanjutnya untuk diujikan secara *in vivo* agar diketahui efek farmakologi dari senyawa aktif pada kulit batang *C. burmannii*.

**1.3. Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk membuktikan secara langsung bahwa ekstrak kulit batang *C. burmannii* memiliki penghambatan terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase serta mengetahui golongan senyawa dari fraksi yang aktif pada ekstrak kulit batang *C. burmannii* sehingga diharapkan dapat memberikan informasi yang mendukung secara ilmiah kepada masyarakat bahwa kulit batang *C. burmannii* dapat dikonsumsi sebagai alternatif pengobatan antidiabetes.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tanaman Kayu Manis

*Cinnamomum burmannii* adalah tanaman asli Asia Tenggara, biasanya digunakan sebagai rempah-rempah, dapat juga sebagai tanaman hias dan sebagai pohon hutan (Starr, F., K. Starr, dan Loope, 2003). *C. burmannii* merupakan spesies yang berasal dari Famili Lauraceae, sering dikenal dengan nama *Cinnamomum tree*, biasanya disebut dengan *padang cassia*. Sedangkan dalam bahasa Indonesia biasa disebut kayu manis (BPOM, 2009). Tanaman ini tumbuh di wilayah Malaysia-Indonesia dan secara komersial dibudayakan di kepulauan Indonesia. Pertumbuhannya paling banyak tersebar di Sumatra, Jawa, Jambi serta meluas hingga ke Timor (Ravindran, Babudan dan Shylaja, 2004).

Rempah-rempah bernama latin *C. burmannii* ini sudah lama dipercaya dapat mengobati kencing manis atau diabetes melitus. Kayu manis banyak tumbuh di Indonesia, seperti di Sumatera. Namun, penggunaan kayu manis sebagai obat sudah dipatenkan di Amerika Serikat dengan merk dagang Cinulin (Ziegenfuss *et al.*, 2006). Mekanisme kerjanya adalah dengan cara meningkatkan sensitivitas insulin (Hongxiang, Tang dan Liang, 2009).

##### 2.1.1. Taksonomi tanaman kayu manis (*C. burmannii*)

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Laurales
Suku	: Lauraceae
Marga	: Cinnamomum
Jenis	: <i>Cinnamomum burmannii</i> (Nees & T.Nees) Blume

2.1.2. Sinonim : *Cinnamomum dulce* Nees, *Cinnamomum kiamis* Nees (Asean, 2004 ; Heyne, 1987).

2.1.3. Nama daerah dan nama asing tanaman kayu manis (*C. burmannii*)

a. Nama daerah :

Sumatra : Holim, holim manis, matang kulik manih, kayu manis, kanigar, modang siak-siak.

Jawa : Huru mentek, ki amis , manis jangan, kanyengar.

Nusa Tenggara : Kesingar, kecingar, cingar, onte, kaninggu, Puundinga (EISAI, 1995 ; Dalimartha, 2009).

b. Nama asing :

*Padang cassia, Padang cinnamon, Cassia vera, Indonesian cassia, Indonesian cinnamon, Batavia cinnamon, Batavia cassia, Java cassia, Fagot cassia, Korintji cassia, Cinnamon tree, kaneelkassia, yin xiang pi* (Asean, 2004 ; Ravindran, Babudan dan Shylaja, 2004 ; Dalimartha, 2009).

2.1.4. Nama simplisia : *Cinnamomi Burmannii Cortex*, *Burmanni Cortex* (Asean, 2004 ; Depkes, 1977).

2.1.5. Deskripsi tanaman kayu manis (*C. burmannii* )

Kayu manis dapat ditemukan tumbuh liar di hutan pada ketinggian 0-200 m dpl. Namun tumbuh baik pada tanah yang subur, gembur, agak berpasir, dan kaya bahan organik pada ketinggian 500-1500 m dpl. Pohon memiliki tinggi 10 m, kulit berwarna abu-abu tua, berbau khas, kayu berwarna merah atau coklat muda. Daun tunggal, kaku, panjang tangkai daun 0,5 – 1,5 cm, dan letak berseling. Bentuk daun elips memanjang, ujung meruncing, pangkal runcing, tepi rata dengan 3 buah tulang daun yang tumbuh melengkung, permukaan atas licin warnanya hijau, permukaan bawah bertepung berwarna keabu-abuan, panjang 8-15 cm, lebar 3-4 cm. Daun muda berwarna merah pucat, tetapi ada varietas yang berwarna hijau ungu. Bunga majemuk berkumpul dalam rangkaian berupa malai, panjang tangkai bunga 4-12 mm, berambut halus, keluar dari ketiak daun atau ujung percabangan, bunga kecil-kecil berwarna hijau putih. Buah berbentuk buni, bulat memanjang, panjang sekitar 8 mm berwarna merah (WHO, 1999 ; Dalimartha, 2009).

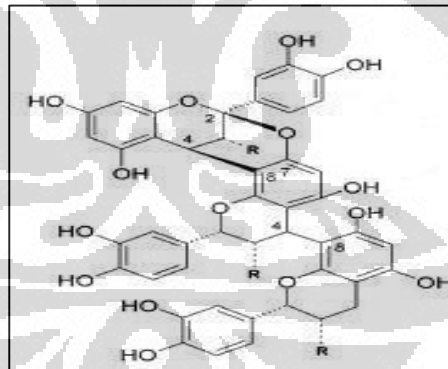
2.1.6. Kandungan kimia dan efek farmakologi tanaman kayu manis (*C. burmannii*)

a. Kandungan kimia

Kayu manis atau cinnamon memiliki kandungan berbagai senyawa kimia, yaitu minyak atsiri sekitar 0,5-2% seperti eugenol, safrol, sinamilaldehida, dan linalol ; polisakarida sekitar 10% ; diterpen serta kumarin (Bradley, 2006) ; komponen fenol sekitar 4-10% seperti tanin terkondensasi (*proanthocyanidins, catechins*) ; gum, mucilago, resin, pati (Dugoua, *et al.*, 2007).

b. Efek Farmakologi :

Kayu manis memiliki efek karminatif, spasmolitik, antibakteri, antifungi, antirematik, anti inflamasi, penambah nafsu makan (stomakik), menghilangkan nyeri (Bradley, 2006) dan antidiabetes (Catherine dan Seamon, 2010). Kayu manis dapat mengontrol glukosa darah karena mengandung senyawa polimer tipe-A polifenol (Ziegenfuss *et al.*, 2006 ; Anderson R.A., 2008).



[Sumber : Anderson *et al.*, 2004]

**Gambar 2.1.** Rumus struktur polimer tipe-A polifenol

Suatu penelitian juga telah menunjukkan bahwa bahan aktif dalam kayu manis yaitu *cinnamaldehyde* dapat menurunkan kadar glukosa plasma pada tikus diabetes (Ping , Zhang dan Ren, 2010).

## 2.2. Simplisia

Simplisia adalah bahan alam yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga, kecuali dinyatakan lain simplisia merupakan bahan yang dikeringkan. Simplisia dapat berupa simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan atau mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman dengan eksudat tanaman, yang dimaksud dengan eksudat adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau isi sel yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya, atau zat-zat nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari selnya. Simplisia hewani adalah simplisia yang dapat berupa kimia utuh atau zat yang berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa kimia murni, sedangkan simplisia pelikan/mineral adalah simplisia yang berupa bahan pelikan/mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa bahan kimia murni (Depkes, 1995).

## 2.3. Ekstrak dan Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kering, kental, cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, diluar pengaruh dari cahaya matahari langsung (*Farmakope Indonesia edisi III*, 1979). Ekstrak yang diperoleh berdasarkan sifatnya dapat dibagi menjadi :

- a. Ekstrak encer (*Extractum tenue*), sediaan ini masih dapat dituang.
- b. Ekstrak kental (*Extractum spissum*), sediaan ini tidak dapat dituang dan memiliki kadar air sampai 30%.
- c. Ekstrak kering (*Extractum siccum*), sediaan ini berbentuk serbuk, dibuat dari ekstrak tumbuhan yang diperoleh dari penguapan bahan pelarut.
- d. Ekstrak cair (*Extractum fluidum*), mengandung simplisia nabati yang mengandung etanol sebagai bahan pengawet (Voight, 1995).

Ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut dari suatu serbuk simplisia, sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut. Terdapat beberapa metode ekstraksi dengan pelarut cair, antara lain cara dingin yaitu maserasi dan perkolasi, serta cara panas yaitu refluks, sokletasi, digesti, infuse, dekok. Berikut adalah penjelasan singkat beberapa metode ekstraksi.

### 2.3.1. Cara Dingin

#### a. Maserasi

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (suhu kamar). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya.

#### b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan atau penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat). (*Parameter*, 2000).

### 2.3.2. Cara panas

#### a. Refluks

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

#### b. 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.

#### c. 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).

d. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air (*Parameter*, 2000).

e. Sokletasi

Sokletasi adalah metode ekstraksi untuk bahan yang tahan pemanasan dengan cara meletakkan bahan yang akan diekstraksi dalam sebuah kantung ekstraksi (kertas saring) di dalam sebuah alat ekstraksi dari gelas yang bekerja kontinyu (Voight, 1955).

#### 2.4. **Fraksinasi**

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain. Pemisahan jumlah dan jenisnya senyawa menjadi fraksi yang berbeda yang tergantung pada jenis tumbuhan. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar (Harborne, 1987).

#### 2.5. **Penapisan Fitokimia**

Penapisan kimia 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, senyawa fenol, flavonoid, glikosida, terpenoid, steroid, tanin dan saponin. Adapun tujuan pendekatan skrining fitokimia adalah untuk mensurvei tumbuhan mendapatkan kandungan yang berguna untuk pengobatan. (Farnsworth, 1966).

##### 2.5.1. Alkaloid

Alkaloid adalah metabolit basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam gabungan berbentuk siklik. Alkaloid mempunyai aktivitas fisiologi sehingga secara luas digunakan dalam bidang pengobatan. Fungsi alkaloid pada tumbuhan masih tidak jelas, namun alkaloid penting dalam pengatur pertumbuhan dan penghalau serangga (Harborne, 1987).

### 2.5.2. Senyawa fenol

Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang mempunyai ciri sama yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua penyulih hidroksil. Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena umumnya sering kali berikatan dengan gula sebagai glikosida, dan biasanya terdapat dalam vakuola sel. Beberapa ribu senyawa fenol telah diketahui strukturnya. Flavonoid merupakan golongan terbesar, tetapi fenol monosiklik sederhana, fenil propanoid, dan kuinon fenolik juga terdapat dalam jumlah yang besar. Beberapa golongan bahan polimer penting dalam tumbuhan seperti lignin, melanin, dan tanin adalah senyawa polifenol. Pendeteksian adanya senyawa ini dapat dilakukan dengan menambahkan larutan besi (III) klorida 1% dalam air atau etanol yang menimbulkan warna hijau, merah ungu, biru atau hitam kuat (Harborne, 1987).

### 2.5.3. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang tersebar luas di alam dapat ditemukan dalam bentuk glikosida maupun aglikonnya. Flavonoid mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi  $C_6-C_3-C_6$  yaitu dua cincin aromatis yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Flavonoid mengandung sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih, atau suatu gula sehingga cukup larut dalam pelarut polar seperti etanol (EtOH), metanol (MeOH), butanol (BuOH), aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida. Adanya gula yang terikat pada flavonoid (bentuk umum yang ditemukan) cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air, sehingga campuran pelarut di atas dan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk glikosida. Aglikon yang kurang polar cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan  $CHCl_3$  (Markham, 1988).

### 2.5.4. Glikosida

Glikosida merupakan suatu senyawa, bila dihidrolisis akan terurai menjadi gula. Glikosida adalah senyawa yang terdiri atas gabungan dua bagian senyawa, yaitu gula dan bukan gula. Bagian gula biasa disebut glikon sedangkan bagian



bukan gula disebut sebagai aglikon (Tyler *et al.*, 1988). Glikosida dibagi atas 4 tipe berdasarkan atom penghubung glikon dan aglikon, yaitu :

- a. O-Glikosida, jika glikon dan aglikon dihubungkan oleh atom O.  
Contoh : Salicin
- b. S-Glikosida, jika glikon dan aglikon dihubungkan oleh atom S.  
Contoh : Sinigrin
- c. N-Glikosida, jika glikon dan aglikon dihubungkan oleh atom N.  
Contoh : Vicine, krotonosida
- d. C-Glikosida, jika glikon dan aglikon dihubungkan oleh atom C.  
Contoh : Aloin (Fransworth, 1966).

#### 2.5.5. Terpen

Terpen adalah suatu senyawa yang tersusun atas isoprene  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$  dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan  $\text{C}_5$  ini. Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa seperti monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap, diterpen yang sukar menguap sampai ke senyawa yang tidak menguap yaitu triterpen, dan sterol.

Secara umum senyawa ini larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya senyawa ini diekstraksi dengan menggunakan eter dan kloroform (Harborne, 1987).

#### 2.5.6. Tanin

Tanin merupakan senyawa yang terdapat dalam tumbuhan dan tersebar luas, memiliki gugus fenol, memiliki rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Jika bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tak larut dalam air.

Tanin secara kimia dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu tanin kondensasi dan tannin terhidrolisis. Tanin terkondensasi atau flavolan secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Tanin terhidrolisis berupa glukosa dikelilingi oleh lima gugus ester. Salah satu fungsi

utama tanin dalam tumbuhan ialah sebagai penolak hewan pemakan tumbuhan (Harborne, 1987).

#### 2.5.7. Saponin

Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun, dapat membentuk busa bila dikocok dengan air dan dapat menghemolisis sel darah merah (Harborne, 1987). Dua jenis saponin yang dikenal yaitu glikosida triterpenoid alkohol dan glikosida struktur steroid.

#### 2.5.8. Kuinon

Kuinon adalah senyawa berwarna dan mempunyai kromofor dasar. Warna pigmen kuinon alam beragam, mulai dari kuning pucat sampai ke hampir hitam. Pigmen ini sering terdapat dalam kulit, akar atau dalam jaringan lain (misalnya daun). Penyebarannya dalam tumbuhan cukup tinggi dan telah diteliti terutama karena antrakuinon tertentu, berkhasiat sebagai pencahar. Senyawa kuinon yang terdapat sebagai glikosida larut sedikit dalam air, tetapi umumnya kuinon lebih mudah larut dalam lemak. Untuk memastikan adanya adanya suatu pigmen termasuk kuinon atau bukan, reaksi warna sederhana masih tetap berguna. Reaksi yang khas ialah reduksi bolak balik yang mengubah kuinon menjadi senyawa tanpa warna, kemudian warna kembali lagi bila terjadi oksidasi oleh udara (Harbone, 1987).

### 2.6. **Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka dikenal istilah kromatografi penyerapan, bila fase diam berupa zat cair, maka teknik ini disebut kromatografi pembagian.

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi (pembagian) atau gabungannya. Lempeng pemisah tipis yang terdiri dari butir penyerap atau pendukung dilapiskan pada lempeng kaca, logam, dan lain-lain. Untuk mendapatkan kondisi jenuh bejana

kromatografi, dinding bejana dilapisi dengan lembaran kertas saring, fase gerak dituang ke dalam bejana sehingga kertas saring basah dan dalam bejana terdapat fase gerak setinggi 5-10 mm. Bejana ditutup dan dibiarkan selama satu jam pada 20°-25°.

Fase diam yang umum digunakan antara lain silika gel, alumina, tanah diatomeae, dan serbuk selulosa. Silika gel bersifat asam dan berguna untuk kromatografi pembagian maupun penyerapan. Alumina yang bersifat basa terutama digunakan untuk kromatografi penyerapan (Harmita, 2006). Pemilihan fase gerak tergantung pada sifat campuran senyawa yang akan dipisahkan. Polaritas fase gerak dan senyawa disesuaikan untuk mendapatkan sistem pengembang yang akan digunakan. Urutan pelarut sesuai dengan efek eluasinya disebut *eluotropic series*. Keuntungan kromatografi lapis tipis untuk ekstrak tanaman sangat penting, karena memiliki campuran senyawa kimia yang sangat kompleks yang berbeda secara struktural. (Waksmundzka, Sherma, dan Kowalska, 2008). Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah pada lapisan tipis menggunakan harga Rf.

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh zat}}{\text{Jarak yang ditempuh pengembang}} \quad (2.1)$$

## 2.7. **Diabetes Melitus**

Diabetes berasal dari bahasa Yunani yang berarti “mengalirkan atau mengalihkan”. Melitus dari bahasa latin yang bermakna manis atau madu. Penyakit diabetes melitus dapat diartikan individu yang mengalirkan volume urin yang banyak dengan kadar glukosa tinggi. Diabetes melitus adalah penyakit hiperglikemia yang ditandai dengan kekurangan hormon insulin baik absolut maupun relatif. Hasil pemeriksaan kadar glukosa darah sewaktu > 200 mg/dl dan kadar glukosa darah puasa > 126 mg/dl dapat digunakan sebagai patokan diagnosis diabetes melitus (Dirjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2005). Beberapa gejala diabetes antara lain:

- a. Poliuria (peningkatan pengeluaran urin) karena air mengikuti glukosa yang keluar melalui urin.

- b. Polidipsia (peningkatan rasa haus) akibat volume urine yang sangat besar dan keluarnya air yang menyebabkan dehidrasi ekstra sel. Dehidrasi intrasel mengikuti dehidrasi ekstrasel karena air intrasel akan berdifusi keluar sel mengikuti penurunan gradien konsentrasi ke plasma yang hipertonik (konsentrasi tinggi).
- c. Rasa lelah dan kelemahan otot akibat katabolisme protein di otot dan ketidakmampuan sebagian besar sel untuk menggunakan glukosa sebagai energi.
- d. Polifagia (peningkatan rasa lapar) akibat katabolisme protein dan lemak, dan kelaparan relatif sel (Corwin, 2008).

Dokumen konsensus tahun 1997 oleh *American Diabetes Association's Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus* menjabarkan empat kategori utama diabetes :

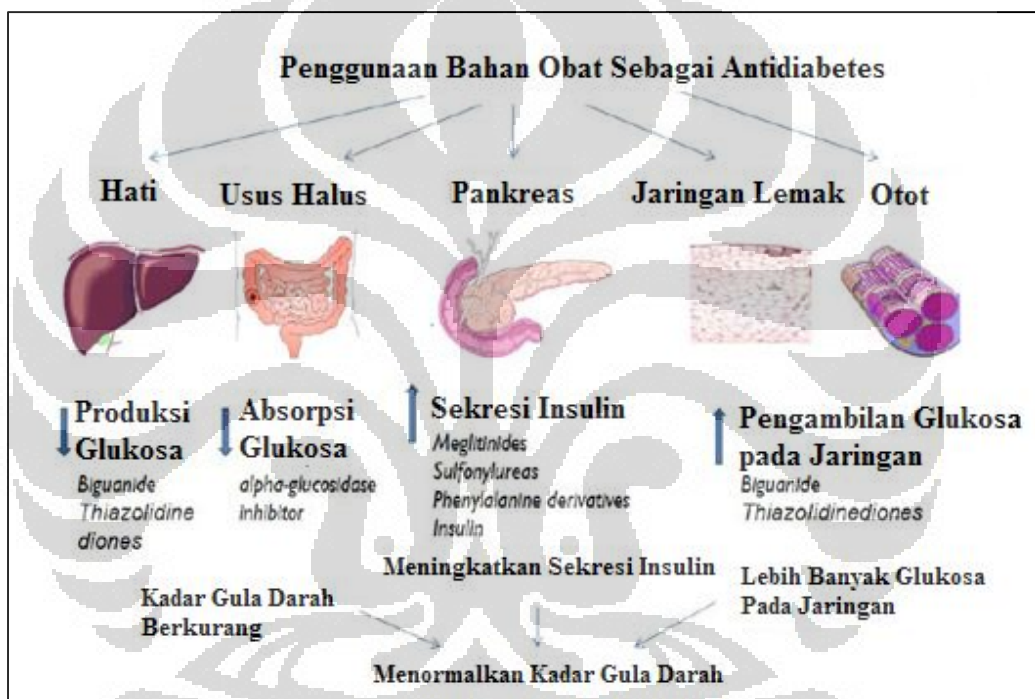
- a. **Diabetes Melitus tipe I**  
Diabetes melitus tipe I adalah penyakit hiperglikemia akibat ketiadaan absolut insulin. Diabetes jenis ini timbul bila pankreas kehilangan kemampuannya untuk menghasilkan insulin. Sebelumnya, tipe diabetes ini disebut sebagai diabetes melitus dependen insulin (IDDM), karena individu pengidap penyakit ini harus mendapat insulin pengganti. (Corwin, 2008).
- b. **Diabetes melitus tipe II**  
Pada Penderita diabetes ini, pankreas masih berfungsi tetapi menunjukkan defisiensi relatif, sehingga tubuh kehilangan kemampuan untuk memanfaatkan insulin secara efektif (Hongxiang, Tang dan Liang, 2009). Diabetes melitus tipe II tidak tergantung dari insulin , maka disebut Non Insulin Dependen Diabetes Melitus (NIDDM) (Tjay dan Rahardja, 2007).
- c. **Diabetes Melitus tipe III**  
Pada diabetes tipe III, hiperglikemia berkaitan dengan penyakit-penyakit lain. Penyakit tersebut meliputi pankreatektomi atau penyakit pankreas, kelainan genetik pada kerja insulin, penyakit endokrin seperti sindrom *cushing*, akromegali atau penyakit endokrin lain (Ganong, 1996).

d. Diabetes Melitus tipe IV

Diabetes melitus tipe 4 atau diabetes gestasional, adalah diabetes yang terjadi pada wanita hamil yang sebelumnya tidak mengidap diabetes (Corwin, 2008).

## 2.8. Antidiabetes Oral

Mekanisme kerja obat hipoglikemik oral antara lain melalui perangsangan sekresi insulin, sensitiser insulin dan penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase (Hongxiang, Tang dan Liang, 2009).



[Sumber : Hongxiang, Tang dan Liang, 2009]  
(Gambar telah diolah kembali)

**Gambar 2.2.** Tempat aksi obat pada pengobatan diabetes

a. Peningkatan sekresi insulin : *Sulfonylureas* (*glibenclamide, gliclazide, glipizide, glimepiride*).

*Sulphonylureas* awalnya dikembangkan pada tahun 1920 dan telah menjadi sangat diperlukan dalam mengatasi DM tipe 2 (Bösenberg, 2008). Obat golongan *sulphonylureas* mempunyai efek utama meningkatkan sekresi insulin oleh sel beta langerhans di pankreas. Obat ini hanya efektif

pada penderita diabetes tipe 2 yang tidak begitu berat, yang sel-sel beta nya masih bekerja cukup baik. (Tjay dan Rahardja, 2007). Pemberian insulin dan *sulphonylurea* yang berlebihan dapat menyebabkan hipoglikemia yang signifikan (Waring, 2007).

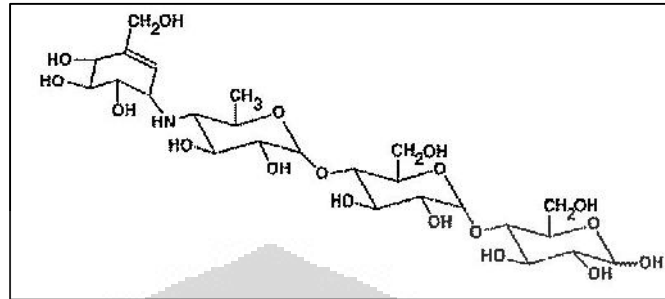
- b. Sensitiser insulin : *Biguanides (metformin)*, *Thiazolidinediones (pioglitazone, rosiglitazone)*

Sensitiser insulin bekerja melalui peningkatan sensitivitas otot dan jaringan lain terhadap insulin (*thiazolidinediones*), serta penurunan glukoneogenesis oleh hati (*biguanides*) (Jarald, Joshi, dan Jain, 2008). *Metformin* telah tersedia sejak 1950. *Biguanides* umumnya dianggap sebagai obat pilihan oleh penderita obesitas pada diabetes tipe 2 (Bösenberg, 2008). Derivat *biguanides* mempunyai mekanisme kerja yang berlainan dengan derivat *sulphonylurea*, obat-obat tersebut kerjanya tidak melalui perangsangan sekresi insulin tetapi langsung terhadap organ sasaran (Ganiswarna dkk, 2004). *Thiazolidinedione*, kelas ini obat dapat digunakan sebagai monoterapi pada obesitas maupun non-obesitas pasien yang telah gagal dengan tindakan konservatif lainnya (Bösenberg, 2008).

- c. Inhibitor  $\alpha$ -glukosidase : akarbose dan miglitol

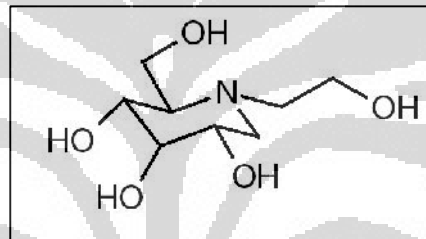
Inhibitor  $\alpha$ -glukosidase menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang berada di usus. Akarbose dan miglitol adalah penghambat kompetitif  $\alpha$ -glukosidase yang mengurangi penyerapan amilum dan disakarida. Akarbose merupakan oligosakarida yang menunda pemecahan karbohidrat (Narkhede *et al.*, 2011) dan diperkenalkan ke pasar pada awal 1990-an (Bösenberg, 2008), secara klinis digunakan pada penderita diabetes tipe 2 (Chiasson *et al.*, 2003). Penguraian disakarida dan oligosakarida dicegah (Bösenberg, 2008), dengan demikian glukosa dilepaskan lebih lambat dan absorpsinya ke dalam darah juga kurang cepat, lebih rendah dan merata, sehingga memuncaknya kadar gula darah bisa dihindari (Tjay dan Rahardja, 2007). Efek samping nya antara lain perut kembung, dan diare. Dosis akarbose dimulai dengan dosis rendah (25 mg 1x sehari), lalu ditingkatkan secara bertahap setelah beberapa bulan sampai dosis maksimum (50 mg 3x kali sehari untuk pasien dengan berat badan  $\leq$  60kg

atau 100 mg 3x sehari untuk pasien dengan berat badan > 60 kg) (Dipiro, *et al.*, 2005).



[Sumber : Katzung, 2006]

**Gambar 2.3.** Struktur kimia akarbose



[Sumber : Katzung, 2006]

**Gambar 2.4.** Struktur kimia miglitol

## 2.9. Enzim

### 2.9.1. Definisi Enzim

Enzim adalah polimer biologis yang mengkatalisis reaksi kimia yang memungkinkan berlangsungnya kehidupan. Keberadaan dan pemeliharaan rangkaian enzim yang lengkap dan seimbang merupakan hal yang penting untuk menguraikan nutrisi menjadi energi dan *chemical building block* (bahan dasar kimiawi), menyusun bahan-bahan dasar tersebut menjadi protein, DNA, membran, sel, dan jaringan, serta memanfaatkan energi untuk melakukan motilitas sel, fungsi saraf, dan kontraksi otot (Murray, Granner dan Rodwell, 2006).

Enzim adalah katalisis yang efektif, yang mengkatalisis perubahan satu atau lebih senyawa (substrat) menjadi satu atau lebih senyawa lain (produk) meningkatkan laju reaksi setidaknya  $10^6$  kali dibandingkan jika tidak dikatalisis. Selain sangat efisien, enzim juga merupakan katalis yang sangat selektif (Murray, Granner dan Rodwell, 2006). Enzim memiliki celah khusus yang disebut dengan

sisi aktif. Sisi aktif terdiri dari rantai samping asam amino yang membentuk permukaan tiga dimensi dan sesuai dengan substrat. Bila sisi aktif enzim berikatan dengan substrat, akan terbentuk kompleks enzim-substrat (ES). ES diubah menjadi enzim-produk (EP), kemudian terpecah menjadi enzim dan produk.



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

Enzim memiliki spesifisitas atau spesifik dalam bereaksi dengan satu atau beberapa substrat dan hanya mengkatalisis satu macam reaksi kimia. Kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, antara lain konsentrasi substrat, suhu, pH (Champe, Harvey, dan Ferrier, 2005) dan waktu inkubasi (Gautam, *et al.*, 2010). Faktor-faktor tersebut menentukan efektivitas kerja suatu enzim. Apabila faktor pendukung tersebut berada pada kondisi yang optimum, maka kerja enzim juga akan maksimal.

### 2.9.2. $\alpha$ -Glukosidase

$\alpha$ -Glukosidase adalah enzim yang bertanggung jawab terhadap konversi karbohidrat menjadi glukosa. Enzim ini merupakan enzim utama untuk memecah karbohidrat dan oligosakarida menjadi monosakarida dalam usus kecil (Lee *et al.*, 2007 ; Narkhede *et al.*, 2011).  $\alpha$ -Glukosidase mengkatalisis hidrolisis ikatan glikosidik  $\alpha$ -1,4 karbohidrat sehingga melepaskan  $\alpha$ -glukosa dan meningkatkan kadar gula darah setelah makan (Wu, 2011).

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



$\alpha$ -Glukosidase pada organisme diklasifikasikan menurut spesifisitas substrat mereka. Tipe I lebih efektif menghidrolisis substrat p-nitrofenil  $\alpha$ -glukopiranosida (pNPG) dari pada maltosa. Tipe II lebih aktif pada maltosa dan isomaltosa serta memiliki aktivitas rendah terhadap pNPG. Tipe III mirip tipe II, tetapi dapat menghidrolisis disakarida, oligosakarida dan pati.  $\alpha$ -Glukosidase dari ragi umumnya berasal dari tipe II atau I (Marin, Linde, dan Lobato, 2006 ; Frandsen, Palcic, dan Svensson, 2002)

## 2.10. Mekanisme Penghambatan Aktivitas Enzim

Suatu zat yang dapat mengurangi kecepatan reaksi katalitik enzim disebut dengan inhibitor. Enzim memiliki sisi aktif yang bersifat spesifik untuk mengenali substrat yang sesuai. Enzim akan bereaksi menghasilkan produk bila sisi aktif berikatan dengan substrat. Senyawa yang merupakan penghambat suatu enzim akan menghambat terbentuknya produk. Mekanisme penghambatan enzim telah dimanfaatkan untuk merancang suatu obat yang bekerja sebagai penghambat enzim (Champe, Harvey, dan Ferrier, 2005).

Penghambatan enzim dapat digolongkan ke dalam dua sifat, yaitu penghambatan *irreversible* dan penghambatan *reversible*. Penghambatan *irreversible* terjadi bila suatu penghambat membentuk ikatan kovalen dengan enzim sehingga membentuk kompleks yang bersifat tetap dan tidak dapat dilepaskan dengan cara pengenceran maupun dialisis. Penghambat *irreversible* disebut juga sebagai inaktifator enzim. Penghambatan *reversible* terjadi bila suatu penghambat membentuk ikatan nonkovalen dengan enzim sehingga dapat dilepaskan dari enzim dengan cara pengenceran, filtrasi gel, atau dialisis (Champe, Harvey, dan Ferrier, 2005). Penghambatan *reversible* memiliki 4 tipe kerja, yaitu penghambatan kompetitif, penghambatan nonkompetitif, penghambatan kompetitif campuran, dan penghambatan unkompetitif (Storey, 2004 ; McPherson & Pincus, 2007).

### a. Penghambatan kompetitif

Penghambatan kompetitif terjadi bila suatu penghambat dengan struktur yang menyerupai substrat normal, berkompetisi dengan substrat normal untuk berikatan pada sisi aktif enzim. Efek dari adanya penghambat

kompetitif adalah meningkatnya konsentrasi substrat yang dibutuhkan untuk dapat mencapai kecepatan reaksi maksimum dalam pembentukan produk (Storey, 2004 ; McPherson & Pincus, 2007).

b. Penghambatan nonkompetitif

Penghambatan nonkompetitif terjadi bila suatu penghambat berikatan dengan sisi yang berbeda dengan substrat normal pada enzim, sehingga substrat masih dapat berikatan dengan sisi aktif enzim. Penghambat yang bersifat nonkompetitif dapat berikatan pada enzim dalam bentuk bebas, maupun pada enzim yang telah membentuk kompleks dengan substrat. Adanya penghambat nonkompetitif tidak dapat diatasi dengan peningkatan konsentrasi substrat untuk dapat mencapai kecepatan reaksi maksimum enzim yang sama dengan kondisi sebelum adanya penghambatan, sehingga kecepatan reaksi maksimum akan menurun dengan adanya penghambat nonkompetitif (Storey, 2004 ; McPherson & Pincus, 2007).

c. Penghambatan kompetitif campuran

Penghambatan kompetitif campuran terjadi bila suatu penghambat berikatan dengan sisi aktif yang berbeda dengan substrat normal pada enzim, sehingga substrat masih dapat berikatan dengan sisi aktif enzim. Penghambat yang bersifat kompetitif campuran dapat berikatan pada enzim dalam bentuk bebas, maupun pada enzim yang telah membentuk kompleks dengan substrat. Adanya ikatan antara suatu penghambat kompetitif campuran dengan enzim akan menyebabkan perubahan konformasi pada sisi aktif enzim, sehingga ikatan antara enzim dengan substrat menjadi tidak optimum. Akibat dari tidak optimumnya ikatan antara enzim dengan substrat tersebut menyebabkan penurunan kecepatan reaksi dalam pembentukan produk (Storey, 2004 ; McPherson & Pincus, 2007).

d. Penghambatan unkompetitif

Penghambatan unkompetitif terjadi bila suatu penghambat berikatan hanya dengan kompleks enzim-substrat dan tidak pada enzim dalam bentuk bebas. Penghambatan jenis ini terjadi bila ikatan antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya perubahan konformasi enzim sehingga

enzim membentuk tempat ikatan dengan suatu penghambat. Adanya ikatan antara penghambat dengan suatu kompleks enzim-substrat akan menyebabkan penurunan kecepatan reaksi maksimum dalam pembentukan produk (Storey, 2004 ; McPherson & Pincus, 2007).

### 2.11. Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim

Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data menggunakan metode *Lineweaver-Burk* untuk memperoleh tetapan kinetika *Michaelis-Menten* (Dewi *et al.*, 2007). Persamaan *Michaelis-Menten* memperlihatkan secara matematis hubungan antara kecepatan reaksi yang bervariasi dengan variasi konsentrasi substrat.

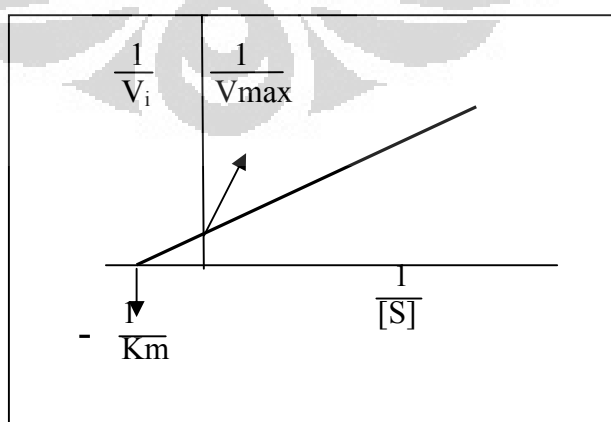
$$v_i = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

Keterangan :  $v_i$  = kecepatan awal reaksi,  $V_{\max}$  = kecepatan maksimum,  $K_m$  = tetapan Michaelis-Menten,  $[S]$  = konsentrasi substrat.

Tetapan kinetika *Michaelis-Menten* dihitung berdasarkan persamaan regresi  $y = a + bx$  yang diperoleh melalui penurunan persamaan *Michaelis-Menten*, dimana  $x$  adalah  $1/[S]$  dan  $y$  adalah  $1/v_i$  (Murray, Granner, & Rodwell, 2006).

$$\frac{1}{v_i} = \left( \frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad y = bx + a \quad (2.2)$$

Persamaan tersebut dapat ditunjukkan dengan grafik pada Gambar 2.5.

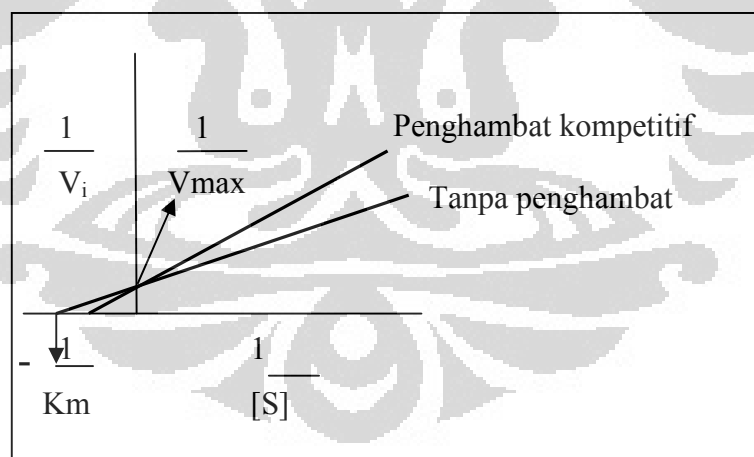


[Sumber : Champe, Harvey, dan Ferrier, 2005]

**Gambar 2.5.** Grafik persamaan *Lineweaver-Burk*

$K_m$  adalah tetapan *Michaelis-Menten* yang mencerminkan afinitas enzim terhadap substrat. Nilai  $K_m$  yang kecil mencerminkan afinitas yang besar, sebab kecepatan reaksi maksimum dapat diraih pada konsentrasi substrat yang rendah, sedangkan nilai  $K_m$  yang besar mencerminkan afinitas yang kecil, sebab kecepatan reaksi maksimum hanya dapat diraih pada konsentrasi substrat yang tinggi. Nilai  $K_m$  secara numerik berbanding lurus dengan konsentrasi substrat (Champe, Harvey, dan Ferrier, 2005).

Jenis penghambatan dapat ditentukan dengan grafik persamaan *Lineweaver-Burk*. Adanya penghambat kompetitif akan menyebabkan peningkatan jumlah substrat yang dibutuhkan untuk mencapai  $\frac{1}{2} V_{max}$ , sehingga nilai  $K_m$  akan bertambah. Nilai  $K_m$  yang bertambah mencerminkan afinitas enzim terhadap substrat yang semakin kecil akibat adanya inhibitor. Dengan adanya penambahan substrat hingga mencapai konsentrasi tertentu, nilai  $V_{max}$  yang sama dengan kondisi sebelum adanya inhibitor dapat tercapai, sehingga nilai  $V_{max}$  akan tetap (Champe, Harvey, dan Ferrier, 2005) Penghambatan kompetitif dapat ditunjukkan dengan grafik pada Gambar 2.6.

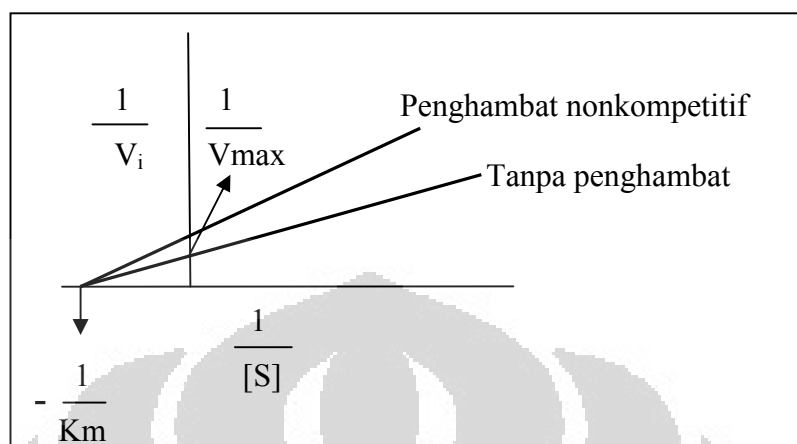


[Sumber : Champe, Harvey, dan Ferrier, 2005]

**Gambar 2.6.** Grafik *Lineweaver-Burk* pada penghambatan Kompetitif

Adanya penghambat nonkompetitif tidak dapat diatasi dengan penambahan jumlah substrat, sebab penghambat nonkompetitif tidak berpengaruh terhadap ikatan enzim dengan substrat, sehingga nilai  $K_m$  yang sebanding dengan konsentrasi substrat akan tetap, sedangkan  $V_{max}$  yang mencerminkan kecepatan

reaksi enzim akan turun (Champe, Harvey, dan Ferrier, 2005). Penghambatan nonkompetitif dapat ditunjukkan dengan grafik pada Gambar 2.7.

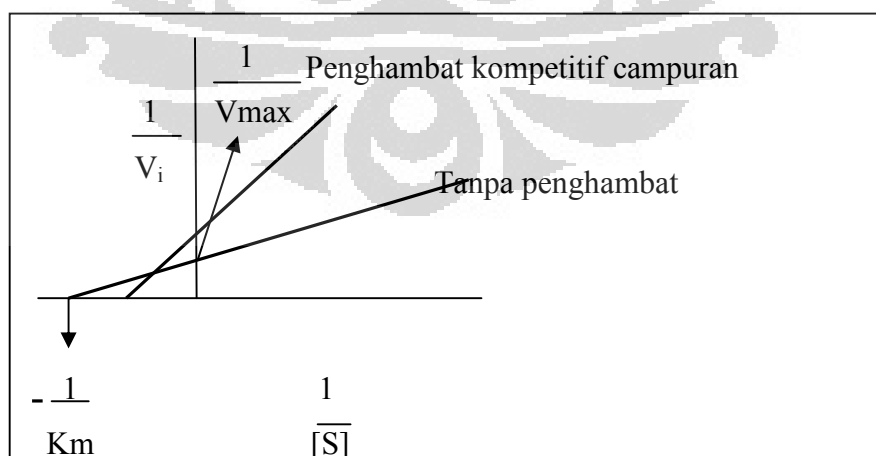


[Sumber : Champe, Harvey, dan Ferrier, 2005]

**Gambar 2.7.** Grafik *Lineweaver-Burk* pada penghambatan nonkompetitif

Adanya penghambat yang bersifat kompetitif campuran akan menyebabkan nilai  $K_m$  bertambah, sebab afinitas enzim terhadap substrat semakin berkurang akibat adanya perubahan bentuk pada sisi aktif enzim, sedangkan nilai  $V_{max}$  yang mencerminkan kecepatan reaksi enzim akan turun, sebab ikatan antara enzim dengan substrat menjadi tidak optimal (Storey, 2004).

Penghambatan kompetitif campuran dapat ditunjukkan dengan grafik pada Gambar 2.8

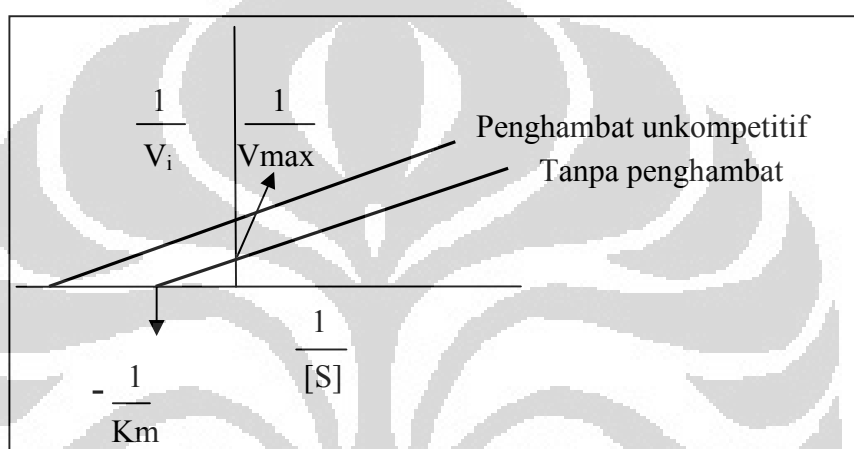


[Sumber : Storey, 2004]

**Gambar 2.8.** Grafik *Lineweaver-Burk* pada penghambatan kompetitif campuran

Penghambat unkompetitif hanya dapat menyerang suatu kompleks enzim-substrat. Dengan adanya penghambat unkompetitif, berkurangnya nilai  $K_m$  disebabkan oleh besarnya afinitas enzim terhadap substrat, sedangkan berkurangnya nilai  $V_{max}$  disebabkan oleh adanya penghambat yang berikatan dengan kompleks enzim-substrat, sehingga kecepatan reaksi enzim berkurang (McPherson & Pincus, 2007).

Penghambatan unkompetitif dapat ditunjukkan dengan grafik pada Gambar 2.9.

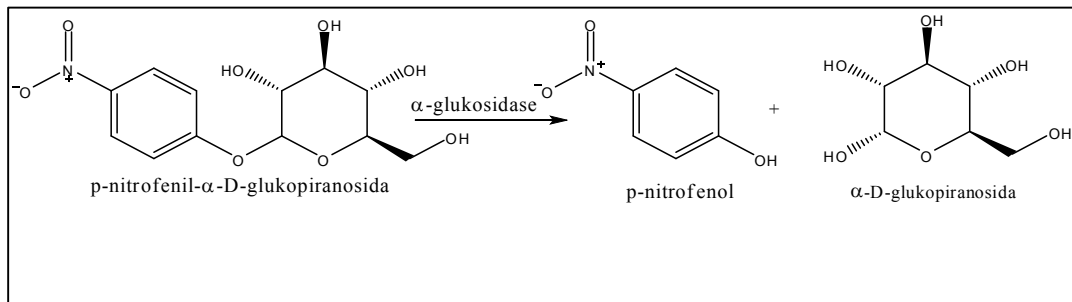


[Sumber : McPherson & Pincus, 2007]

**Gambar 2.9.** Grafik *Lineweaver-Burk* pada penghambatan unkompetitif

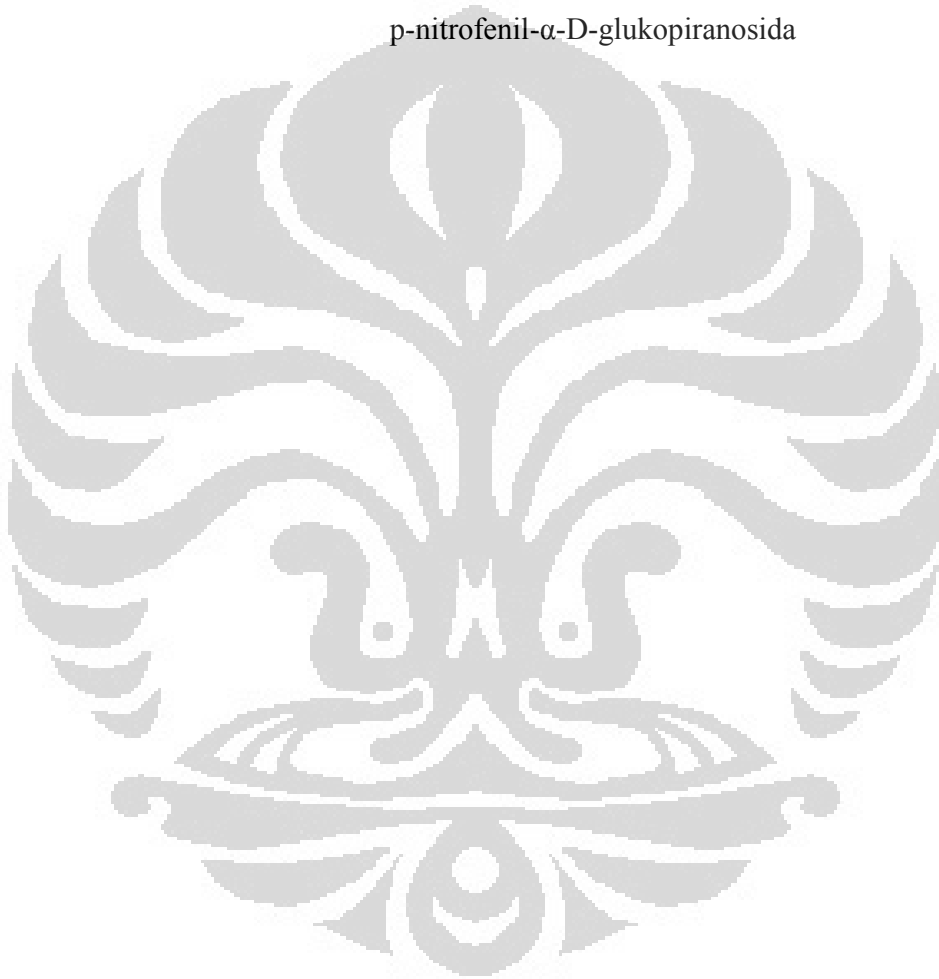
## 2.12. Uji Inhibisi $\alpha$ -Glukosidase

Uji penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dilakukan dengan reaksi enzimatik. Pada pengujian *in vitro*,  $\alpha$ -glukosidase akan menghidrolisis substrat *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida menjadi *p*-nitrofenol (berwarna kuning) dan glukosa. Aktivitas enzim diukur berdasarkan hasil absorbansi *p*-nitrofenol. Intensitas warna kuning yang terbentuk ditentukan serapannya 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. Reaksi enzimatik  $\alpha$ -glukosidase dan *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida dapat dilihat pada reaksi sebagai berikut (Sugiwati, Setiasi dan Afifah, 2009):



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

**Gambar 2.10.** Persamaan reaksi enzimatik  $\alpha$ -glukosidase dan p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida



## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilakukan pada bulan September hingga Desember 2011 di Laboratorium Penelitian Fitokimia dan Laboratorium Farmakognosi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA UI) Depok.

#### **3.2. Bahan**

##### **a. Simplisia**

Pada penelitian ini digunakan bagian kulit batang dari *Cinnamomum burmannii* (Nees & T.Nees) Blume yang berasal dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) Bogor dan telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Cibinong Bogor.

##### **b. Bahan kimia**

Bovine serum albumin (Merck), akarbose (Dexa Medica), paranitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (Wako Pure Chemical Industries, Ltd),  $\alpha$ -glukosidase (Sigma Aldrich), kalium dihidrogen fosfat (Merck), dimetilsulfoksida (Merck), iodium (Merck), kalium iodida (Merck), bismuth (III) nitrat (Merck), raksa (II) klorida (Merck), asam sulfat (Merck), asam asetat anhidrat (Univar), natrium sulfat anhidrat (Merck), serbuk asam borat, serbuk asam oksalat, serbuk zink, serbuk Mg, (Merck),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck), NaOH (Univar), HCl (Merck), NaCl (Mallinckrodt Chemicals),  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3$ , benzen, eter, petroleum eter, etil asetat, n-butanol, metanol, etanol.

#### **3.3. Alat**

Alat penggiling, botol coklat, penangas air, spektrofotometer UV-Vis, pipet volume, pipet mikro 10-100  $\mu\text{L}$  dan 100-1000  $\mu\text{L}$ , kuvet kuarsa, plat tetes, batang pengaduk, spatel, sendok tanduk, gelas arloji, penguap vakum putar (rotavapor), rak tabung reaksi, timbangan analitik, pH-meter, alat-alat-gelas.



### 3.4. Prosedur Kerja

Langkah kerja dalam penelitian ini diawali dengan penyiapan bahan, penyiapan simplisia, selanjutnya dilakukan pembuatan ekstrak, fraksinasi, uji pendahuluan kondisi optimum, uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase, uji kinetika penghambatan enzim dan identifikasi golongan senyawa kimia. Masing-masing tahapan tersebut akan dijelaskan sebagai berikut:

#### 3.4.1. Penyiapan bahan

Kulit kayu manis diperoleh dari dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) Bogor pada bulan Agustus 2011. Bagian tanaman yang digunakan adalah kulit batang kayu manis yang berumur 8 tahun dengan diameter pohon 25 cm yang di budidayakan di Balitro Bogor.

#### 3.4.2. Pembuatan simplisia

Kulit batang kayu manis disortasi basah untuk memisahkan bagian tanaman yang rusak, serta kotoran atau bahan-bahan asing lainnya yang masih menempel pada bahan. Selanjutnya dilakukan perajangan untuk membantu mempercepat proses pengeringan dan penggilingan. Kemudian, rajangan dikeringkan di bawah paparan sinar matahari dan ditutup dengan kain hitam untuk mencegah kerusakan kandungan kimia tanaman yang disebabkan sinar UV dari matahari. Setelah itu, simplisia dihaluskan dengan penggiling untuk memperbesar luas permukaan partikel agar kontak antara zat dan larutan penyari lebih besar.

#### 3.4.3. Pembuatan ekstrak

Serbuk kayu manis dimaserasi dengan pelarut etanol 80% selama 1 hari pada suhu kamar di dalam botol coklat. Kemudian rendaman disaring, filtratnya disimpan sementara residunya direndam kembali dalam pelarut yang sama. Perlakuan ini diulang sebanyak lima kali. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diuapkan pelarutnya dengan *rotary vaccum evaporator* (pada suhu 50°C) sehingga diperoleh ekstrak kental. Selanjutnya ekstrak kental dihilangkan airnya dengan menggunakan *freeze-dryer* agar diperoleh ekstrak kering. Ekstrak kering yang diperoleh, ditimbang untuk mengetahui rendemen yang dihasilkan.

#### 3.4.4. Fraksinasi

Ekstrak kering difraksinasi berturut-turut secara fraksinasi cair-cair dengan pelarut yang kepolarannya meningkat dimulai dari petroleum eter, etil asetat dan n-butanol. Ekstrak kering diencerkan dengan air panas, diaduk terus sampai homogen, kemudian dimasukkan dalam corong pisah, difraksinasi dengan petroleum eter yang jumlahnya sama banyak dengan air, diperoleh fraksi petroleum eter dan fraksi air. Fraksi petroleum eter dipisahkan, kemudian fraksi air difraksinasi dengan etil asetat, diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. Fraksi etil asetat dipisahkan, fraksi air difraksinasi dengan butanol, diperoleh fraksi n-butanol dan fraksi air. Hasil penyarian diperoleh 4 fraksi, masing-masing fraksi dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak pekat.

#### 3.4.5. Penyiapan larutan pereaksi

##### 3.4.5.1. Pereaksi identifikasi kandungan kimia (Harborne, 1987 ; Depkes, 1995)

a. 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 dalam 100 mL akuades.

b. Larutan pereaksi Mayer

Larutan I.  $\text{HgCl}_2$  1,358 g dalam akuades 60 mL

Larutan II. KI 5 g dalam akuades 10 mL

Cara pembuatannya adalah:

Larutan I dibuat dengan  $\text{HgCl}_2$  1,358 g yang dilarutkan dengan akuades 60 mL dan larutan II dibuat dengan KI 5 g yang dilarutkan dengan akuades 10 mL. Larutan I dituangkan ke dalam larutan II, diencerkan dengan akuades sampai tanda batas pada labu ukur 100 mL.

c. Larutan pereaksi Dragendorff

Larutan I. 0,6 g bismut subnitrat dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

Larutan II. 6 g KI dalam 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

Kedua larutan tersebut dicampur dengan 7 mL HCl pekat dan 15 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

### 3.4.5.2. Pereaksi uji penghambatan aktivitas $\alpha$ -glukosidase

a. Larutan dapar fosfat pH 6,8

Larutan dapar fosfat pH 6,8 dibuat dengan menimbang 0,6804 g kalium dihidrogen fosfat, kemudian dilarutkan dalam 50 ml aqua akuades. Tambahkan 22,4 ml NaOH 0,1 N, ukur pH dengan menggunakan pH meter, tambahkan lagi NaOH 0,1 N jika belum mencapai pH 6,8. Cukupkan dengan akuades sampai 200 ml.

b. Larutan dapar fosfat pH 7,0

Larutan dapar fosfat pH 7,0 dibuat dengan menimbang 0,6804 g kalium dihidrogen fosfat, kemudian dilarutkan dalam 50 ml aqua akuades. Tambahkan 29,1 ml NaOH 0,1 N, ukur pH dengan menggunakan pH meter, tambahkan lagi NaOH 0,1 N jika belum mencapai pH 7,0. Cukupkan dengan akuades sampai 200 ml.

c. Larutan dapar fosfat pH 7,2

Larutan dapar fosfat pH 7,2 dibuat dengan menimbang 0,6804 g kalium dihidrogen fosfat, kemudian dilarutkan dalam 50 ml aqua akuades. Tambahkan 34,7 ml NaOH 0,1 N, ukur pH dengan menggunakan pH meter, tambahkan lagi NaOH 0,1 N jika belum mencapai pH 7,2. Cukupkan dengan akuades sampai 200 ml.

d. Larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M

Sebanyak 42,2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ditimbang. Kemudian dilarutkan dalam akuades hingga 2000 mL.

e. Larutan enzim

Larutan pembawa enzim dibuat dengan cara 200 mg bovine serum albumin (BSA) dilarutkan dalam 100 ml dapar fosfat pH 7,0. Larutan enzim dibuat dengan cara 1,2 mg  $\alpha$ -glukosidase dilarutkan dalam 100 ml larutan pembawa enzim dalam kondisi dingin. Kemudian larutan induk enzim diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,0 hingga diperoleh larutan enzim 0,0279 U/mL.

f. Larutan substrat.

Sebanyak 30,125 mg substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) dilarutkan dalam 10 mL akuades sehingga diperoleh larutan substrat

dengan konsentrasi 10mM. Larutan substrat 10 mM diencerkan sehingga diperoleh larutan substrat dengan konsentrasi 5mM ; 2,5 mM ; 1,25 mM. Pada pembuatan konsentrasi 30 mM dibuat dengan menimbang 90,375 mg p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) kemudian dilarutkan dalam 10 mL akuades sehingga diperoleh larutan substrat 30 mM. Larutan substrat 30 mM diencerkan sehingga diperoleh larutan substrat dengan konsentrasi 15mM.

#### 3.4.6. Uji pendahuluan kondisi optimum

Uji pendahuluan yang dilakukan adalah penentuan pH, waktu inkubasi dan konsentrasi substrat optimum yang digunakan pada reaksi enzimatik agar reaksi berlangsung optimal.

##### a. Penentuan Konsentrasi Enzim

Sebanyak 20  $\mu$ L DMSO ditambahkan dengan 980  $\mu$ L dapar fosfat pH 7,0 dan 500  $\mu$ L p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) dengan konsentrasi 10 mM, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 500  $\mu$ L larutan enzim dengan konsentrasi 0,0279 U/mL, lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah itu, ditambahkan 2000  $\mu$ L 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sebagai penghenti reaksi. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  400 nm. Uji pada kontrol blangko dilakukan dengan cara menambahkan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> terlebih dahulu sebelum penambahan enzim. Perhitungan aktivitas enzim dapat dilakukan menggunakan rumus berikut (Sigma Aldrich, 1996).

$$\text{Unit/mL} = \frac{(A_{400} \text{ sampel} - A_{400} \text{ blangko}) \times V \times df}{18,3 \times V_e \times t} \quad (3.1)$$

$$\text{Unit/mg enzim} = \text{Unit / ml enzim} \times (1/C)$$

Keterangan : A<sub>400</sub> sampel = Absorbansi larutan sampel pada  $\lambda$  400 nm, A<sub>400</sub> blangko = Absorbansi larutan blangko pada  $\lambda$  400 nm, V = Volume total, df = Faktor pengenceran, 18,3 = Koefisien ekstingsi milimolar p-nitrofenol pada  $\lambda$  400 nm, V<sub>e</sub> = Volume enzim (mL), t = Waktu inkubasi, C = Banyaknya  $\alpha$ -glukosidase dalam larutan uji (mg/mL).

b. Penentuan Optimasi pH

Penentuan optimasi pH dilakukan dengan menggunakan dapar fosfat pada pH 6,8 ; 7,0 dan 7,2 secara berurutan. Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  DMSO ditambahkan dengan 980  $\mu\text{L}$  dapar fosfat dan 500 $\mu\text{L}$  p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) dengan konsentrasi 10 mM, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan enzim dengan konsentrasi 0,0279 U/ml, lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah itu, ditambahkan 2000  $\mu\text{L}$  200 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sebagai penghenti reaksi. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  400 nm. Uji pada kontrol blangko dilakukan dengan cara menambahkan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  terlebih dahulu sebelum penambahan enzim.

c. Penentuan Optimasi Waktu Inkubasi

Penentuan optimasi waktu inkubasi dilakukan dengan waktu inkubasi 15, 20 dan 30 menit secara berurutan. Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  DMSO ditambahkan dengan 980  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pada pH 7,0 dan 500 $\mu\text{L}$  p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) dengan konsentrasi 10 mM, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan enzim dengan konsentrasi 0,0279 U/ml, lalu diinkubasi pada suhu 37°C. Setelah itu, ditambahkan 2000  $\mu\text{L}$  200 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sebagai penghenti reaksi. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  400 nm. Uji pada kontrol blangko dilakukan dengan cara menambahkan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  terlebih dahulu sebelum penambahan enzim.

d. Penentuan Optimasi Konsentrasi Substrat

Penentuan optimasi konsentrasi substrat dilakukan pada konsentrasi substrat dengan konsentrasi masing-masing 30mM dan 20mM, 15 mM, 10mM, 5 mM, 2,5 mM, 1,25mM dan 0,625 mM secara berurutan. Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  DMSO ditambah dengan 980  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pada pH 7,0 dan 500  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG), lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Tambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan enzim dengan konsentrasi 0,0279 U/ml, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah itu, tambahkan 2000  $\mu\text{L}$  200mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sebagai penghenti reaksi.

Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  400 nm. Uji pada kontrol blangko dilakukan dengan cara menambahkan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  terlebih dahulu sebelum penambahan enzim.

#### 3.4.7. Uji penghambatan aktivitas $\alpha$ -glukosidase (Dewi *et al.*, 2007)

Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dilakukan terhadap larutan akarbose sebagai standar positif, larutan blangko, serta larutan ekstrak sebagai sampel. Sebelum dilakukan pengujian, terlebih dahulu dilakukan penyiapan larutan akarbose dan penyiapan larutan sampel.

##### a. Penyiapan Larutan Akarbose

Sebanyak 100 mg akarbose dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO) secukupnya dan larutan dapar fosfat pH 7,0 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi larutan akarbose 1%. Larutan akarbose 1% dipipet 5,0 mL lalu ditambahkan dengan 10,0 mL larutan dapar fosfat pH 7,0 hingga diperoleh konsentrasi larutan 0,5%, demikian seterusnya hingga diperoleh konsentrasi 0,25%, dan 0,125%.

##### b. Penyiapan Larutan Sampel

Sebanyak 100 mg ekstrak kental dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO) secukupnya dan larutan dapar fosfat pH 7,0 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi larutan ekstrak 1%. Larutan ekstrak 1% dipipet 5,0 mL lalu ditambahkan dengan 10,0 mL larutan dapar fosfat pH 7,0 hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 0,5%, demikian seterusnya hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 0,25%, dan 0,125%.

##### c. Pengujian Blangko

Sebanyak 20 $\mu$ L larutan dimetil sulfoksida (DMSO) ditambah dengan 980 $\mu$ L dapar fosfat pada pH 7,0 dan 500 $\mu$ L larutan substrat p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) dengan konsentrasi 15 mM. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Tambahkan 500 $\mu$ L larutan enzim dengan konsentrasi 0,0279 U/ml, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah itu, tambahkan 2000 $\mu$ L 200mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  400 nm. Uji pada kontrol blangko dilakukan dengan penambahan larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  terlebih dahulu sebelum penambahan enzim.

d. Pengujian Akarbose

Sebanyak 20 $\mu$ L larutan akarbose ditambah dengan 980 $\mu$ L dapar fosfat pada pH 7,0 dan 500 $\mu$ L larutan substrat p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) dengan konsentrasi 15 mM. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Tambahkan 500 $\mu$ L larutan enzim dengan konsentrasi 0,0279 U/ml, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah itu, tambahkan 2000 $\mu$ L 200mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  400 nm. Uji pada kontrol akarbose dilakukan dengan penambahan larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> terlebih dahulu sebelum penambahan enzim.

e. Pengujian Sampel

Sebanyak 20 $\mu$ L larutan ekstrak ditambah dengan 980 $\mu$ L dapar fosfat pada pH 7,0 dan 500 $\mu$ L larutan substrat p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) dengan konsentrasi 15 mM. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Tambahkan 500 $\mu$ L larutan enzim dengan konsentrasi 0,0279 U/ml, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah itu, tambahkan 2000 $\mu$ L 200mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  400 nm. Uji pada kontrol sampel dilakukan dengan penambahan larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> terlebih dahulu sebelum penambahan enzim.

Sistem reaksi uji penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 3.1.** Sistem reaksi uji penghambatan  $\alpha$ -glukosidase

Preparat	Volume					
	Bo ( $\mu$ L)	B <sub>1</sub> ( $\mu$ L)	So ( $\mu$ L)	S <sub>1</sub> ( $\mu$ L)	Ao ( $\mu$ L)	A <sub>1</sub> ( $\mu$ L)
Inhibitor	-	-	20	20	20	20
DMSO	20	20	-	-	-	-
Dapar	980	980	980	980	980	980
pNPG	500	500	500	500	500	500
Inkubasi (37°C)	5 menit					
Enzim	-	500	-	500	-	500
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2000	-	2000	-	2000	-
Inkubasi (37°C)	30 menit					
Enzim	500	-	500	-	500	-
Natrium Karbonat	-	2000	-	2000	-	2000

Keterangan: Bo = Kontrol blangko, B<sub>1</sub> = Blangko, So = Kontrol sampel, S<sub>1</sub> = Sampel, Ao = Kontrol akarbose, A<sub>1</sub> = Akarbose.

Masing-masing pengujian dilakukan sebanyak 2 kali. Aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dapat ditentukan dari % penghambatan dan  $IC_{50}$ .

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

Keterangan:

B = selisih absorbansi blangko dengan absorbansi kontrol blangko

S = selisih absorbansi sampel dengan absorbansi control sampel

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

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

#### 3.4.8. Uji Kinetika penghambatan enzim

Sebanyak 20  $\mu$ L larutan ekstrak dengan 4 konsentrasi yang berbeda ditambahkan dengan 980  $\mu$ L dapar fosfat pH 7,0 dan 500  $\mu$ L larutan substrat p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) dengan 4 konsentrasi berbeda. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C, lalu ditambahkan 500  $\mu$ L larutan enzim dengan konsentrasi 0,0279 U/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 2000  $\mu$ L  $Na_2CO_3$  200 mM. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  400 nm. Uji pada larutan kontrol dilakukan dengan penambahan  $Na_2CO_3$  terlebih dahulu sebelum penambahan enzim.

Jenis penghambatan ditentukan dengan analisis data menggunakan *Lineweaver-Burk* untuk mendapatkan tetapan kinetika *Michaelis-Menten* yang dihitung berdasarkan persamaan regresi  $y = a + bx$ , di mana  $1/[S]$  sebagai sumbu x dan  $1/V$  sebagai sumbu y, sehingga akan diperoleh tetapan *Michaelis-Menten* sebagai berikut:



$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3.5)$$

$$y = 0 \rightarrow x = -1/K_m$$

$$y = a + b (-1/K_m)$$

$$K_m = b/a \quad (3.6)$$

$$x = 0 \rightarrow y = a = 1/V_{max}$$

$$V_{max} = 1/a \quad (3.7)$$

Jenis penghambatan dapat ditentukan berdasarkan nilai  $K_m$  dan nilai  $V_{max}$  serta dari gambar grafik *Lineweaver-Burk* yang sesuai dengan salah satu gambar pada Gambar 2.5 sampai dengan Gambar 2.8.

#### 3.4.9. Identifikasi golongan senyawa kimia

Golongan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak fraksi yang aktif diidentifikasi dengan uji warna menggunakan pereaksi warna yang spesifik untuk golongan senyawa masing-masing. Skrining fitokimia dilakukan dengan uji reagen dan uji penegasan dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Untuk memastikan informasi yang didapat dari uji reagen, maka dilakukan uji KLT.

#### 3.4.10. Identifikasi golongan senyawa kimia dengan uji reagen (Depkes, 1995 ; Farnsworth, 1966)

##### 3.4.10.1. Identifikasi alkaloid

Sejumlah 500 mg ekstrak dilarutkan dengan 1 ml HCL 2 N dan 9 ml air suling, kemudian panaskan di atas penangas air selama 2 menit, lalu dinginkan. Selanjutnya disaring dan filtrat digunakan sebagai larutan percobaan yang akan digunakan dalam pengujian berikut :

- a. Sejumlah 1mL filtrat dipindahkan pada kaca arloji, lalu ditambahkan 2 tetes Bouchardat LP. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan coklat hitam.
- b. Sejumlah 1mL filtrat dipindahkan pada kaca arloji, lalu ditambahkan 2 tetes Mayer LP. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau kuning yang larut dalam methanol.

- c. Sejumlah 1 mL filtrat dipindahkan pada kaca arloji, lalu ditambahkan 2 tetes Dragendorff LP. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga coklat.

#### 3.4.10.2. Identifikasi glikosida

Sejumlah 500 mg ekstrak ditambah dengan 15 mL HCl 10% . Selanjutnya dipanaskan hingga mendidih, dinginkan kemudian saring. Cuci filtrat dengan 10 mL eter lakukan sebanyak 3 kali. Kemudian kumpulkan filtrat dan uapkan, tambahkan natrium sulfat anhidrat, saring dan uapkan, Tambahkan 2 mL metanol P dan larutan ini digunakan sebagai larutan percobaan.

- a. Larutan percobaan sebanyak 1 mL diuapkan hingga kering, sisanya ditambahkan 5 ml asam asetat anhidrat P dan 10 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> P. Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna biru atau hijau (Reaksi Liebermann Burchard).
- b. Larutan percobaan sebanyak 1 mL diuapkan hingga kering, sisanya dilarutkan dengan 2 mL air dan 5 tetes Molisch LP. Kemudian ditambahkan 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> P dengan hati-hati. Hasil positif ditandai oleh terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan, menunjukkan adanya ikatan gula (Reaksi Molisch).

#### 3.4.10.3. Identifikasi saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air suling panas, dinginkan, kocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2 N buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin.

#### 3.4.10.4. Identifikasi flavonoid

Sejumlah 500 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 ml etanol 96% kemudian dilakukan percobaan sebagai berikut.

- a. Sebanyak 2 ml larutan ekstrak ditambahkan 0,5 gram serbuk seng, kemudian ditambahkan 2 ml HCl 2N, diamkan 1 menit. Setelah itu

ditambahkan 10 tetes HCl pekat. Dalam waktu 2 sampai 5 menit terjadi warna merah intensif, menunjukkan adanya flavonoid.

- b. Sebanyak 2 ml larutan ekstrak, ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat. Terbentuk warna merah jingga hingga ungu menunjukkan adanya flavonoid. Jika terjadi warna kuning jingga, menunjukkan adanya flavon, kalkon, dan auron.
- c. Sebanyak 1 mL larutan diuapkan, setelah itu ditambahkan 2 mL aseton, kemudian ditambahkan beberapa mg asam borat dan asam oksalat. Setelah itu dipanaskan hingga menguap, kemudian ditambahkan 10 mL eter. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya fluoresensi kuning pada sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm.

#### 3.4.10.5. Identifikasi tanin

Sejumlah 500 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 mL air suling panas dan diaduk, didinginkan kemudian disaring. Filtrat sebanyak masing-masing 1 mL dikerjakan sebagai berikut :

- a. Ditambahkan 3 mL larutan gelatin 10% dan diperhatikan adanya endapan.
- b. Ditambahkan 3 mL larutan NaCl-gelatin (larutan gelatin 1% dalam larutan NaCl 10%) dan diperhatikan adanya endapan.
- c. Ditambahkan 2 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  3% dan diperhatikan terjadinya perubahan warna menjadi biru, biru hitam, hijau, biru hijau.

#### 3.4.10.6. Identifikasi antrakuinon

Sebanyak 200 mg ekstrak dilarutkan dengan 5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N, panaskan sebentar kemudian dinginkan. Ditambahkan 10 mL benzene P, dikocok, lalu diamkan. Lapisan benzene dipisahkan, disaring, filtrat berwarna kuning menunjukkan adanya antrakuinon. Kemudian lapisan benzene dikocok dengan 1 mL sampai 2 mL NaOH 2 N, diamkan, lapisan air berwarna merah intensif dan lapisan benzen tidak berwarna.

#### 3.4.10.7. Identifikasi terpen

Sebanyak 200 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 ml eter kemudian diuapkan di dalam cawan penguap. Ke dalam residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat, kemudian 1 tetes  $H_2SO_4$  pekat akan terbentuk warna merah-hijau atau violet-biru.

#### 3.4.11. Identifikasi golongan senyawa kimia dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi golongan senyawa kimia dengan KLT dilakukan untuk penegasan terhadap golongan senyawa yang positif dari hasil uji reagen. Identifikasi dengan KLT digunakan plat silika gel F254. Ekstrak kayu manis dari fraksi yang aktif ditotolkan pada jarak  $\pm 1$  cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler kemudian dikeringkan dan dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawanya. Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, kemudian diamati pada masing-masing hasil nodanya. Pengembang dan reagen penguji masing-masing golongan senyawa adalah sebagai berikut:

a. Flavonoid

Larutan percobaan ditotolkan pada pelat silika gel dengan memakai pengembang n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5) (Wagner dan Bladt, 2001). Deteksi adanya flavonoid menggunakan penyemprot  $AlCl_3$ .

b. Terpen

Totolkan ekstrak yang sudah dipekatkan pada lempeng silika gel dengan memakai pengembang benzene-kloroform (3:7). Deteksi menggunakan penyemprot vanilin- $H_2SO_4$  ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna (Harborne, 1987 ; Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984).

## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Penyiapan Bahan

Pada penelitian ini digunakan kulit batang kayu manis sebagai sampel yang telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Cibinong Bogor. Pohon kayu manis dapat dilihat pada Gambar 4.7. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan adalah kayu manis dengan nama latin *Cinnamomum burmannii* (Nees & T.Nees) Blume. Hasil determinasi dapat dilihat di lampiran 3. Determinasi tanaman dilakukan pada kayu manis untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan adalah benar-benar tanaman kayu manis. Kulit batang kayu manis dikumpulkan kemudian disortasi basah untuk menghilangkan kotoran seperti tanah atau debu yang menempel. Selanjutnya dilakukan perajangan untuk mempercepat proses pengeringan dan mempermudah penggilingan. Kemudian, rajangan dikeringkan di bawah paparan sinar matahari agar sisa air hasil pencucian dapat kering dan ditutup dengan kain hitam untuk mencegah kerusakan kandungan kimia tanaman yang disebabkan sinar UV dari matahari. Rajangan kulit batang kayu manis dapat dilihat pada Gambar 4.8. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air dan mencegah tumbuhnya jamur sehingga dapat disimpan lebih lama dan tidak mudah rusak. Selain itu, kandungan air yang tinggi akan membuat proses pemekatan menjadi sulit pada hasil ekstraksi. Setelah itu dihitung nilai susut pengeringan tanaman dengan menggunakan rumus berikut.

$$\frac{\text{Bobot basah}}{\text{Bobot kering}} \times 100\% \quad (4.1)$$

Nilai susut pengeringan dapat dilihat pada Tabel 4.1 .

**Tabel 4.1.** Nilai % susut pengeringan

Nama Tanaman	Bagian yang digunakan	Bobot basah (kg)	Bobot simplisia kering (g)	Susut pengeringan (%)
<i>Cinnamomum burmannii</i> (Nees & T.Nees) Blume	Kulit batang	8	1,3	83,75

Setelah dilakukan proses pengeringan, selanjutnya simplisia kering dihaluskan dengan penggiling dan diayak dengan ukuran mesh 24 sehingga diperoleh serbuk sampel. Pembuatan serbuk akan mempermudah proses ekstraksi. Semakin kecil ukuran partikel semakin besar luas permukaannya maka kontak antara zat dan cairan penyari akan semakin besar sehingga proses ekstraksi akan semakin efektif.

#### 4.2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi karena pengerjaannya cukup sederhana selain itu zat aktif tidak rusak oleh pemanasan tinggi karena dilakukan pada suhu kamar.

Pelarut yang digunakan adalah etanol 80%. Etanol dipilih sebagai pelarut karena titik didihnya lebih rendah dibandingkan dengan air, sehingga membutuhkan waktu ekstraksi yang lebih cepat. Pelarut campuran etanol dan air adalah pelarut dengan kemampuan ekstraksi yang baik untuk hampir semua senyawa alam yang memiliki berat molekul kecil seperti alkaloid, saponin dan flavonoid (Samuelsson, 1999).

Sebanyak 1 kg serbuk ditimbang menjadi 3 bagian yaitu 300 g, 300 g dan 400 g, lalu masing masing bagian dimasukkan ke dalam botol maserasi. Selanjutnya, ditambahkan etanol 80% sebagai pelarut. Perendaman sampel dilakukan selama waktu 24 jam, pengadukannya dibantu dengan *shaker* selama 6 jam untuk mempercepat kelarutan senyawa ke dalam pelarutnya. Pengadukan diperlukan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar serbuk sampel sehingga tetap terjaga adanya perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam dan di luar sel. Setelah 24 jam, ekstrak di saring, lalu ampas dipisahkan dan

diekstraksi kembali dengan penggantian pelarut yang sama pada setiap harinya sampai 5 kali proses maserasi.

Filtrat hasil dari maserasi yang telah diperoleh selanjutnya diuapkan pelarutnya dengan *rotary vaccum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental yang masih dapat dituang, kemudian dilanjutkan menggunakan penangas air dengan suhu 50°C hingga menjadi ekstrak kental yang pekat. Selanjutnya ekstrak kental dihilangkan airnya menggunakan *freeze-dryer* sehingga diperoleh ekstrak kering. Hasil ekstraksi 1 kg serbuk *C. burmannii* Bl. menggunakan 8 L etanol 80% diperoleh ekstrak kering etanol 80% 320 g, kemudian nilai % rendemen dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak kering}}{\text{Bobot simplisia yang diekstraksi}} \times 100\% \quad (4.1)$$

Bobot ekstrak kering serta nilai % rendemen dapat dilihat pada tabel 4.2

**Tabel 4.2.** Bobot ekstrak kering dan nilai % rendemen

Nama Tanaman	Bagian yang digunakan	Bobot simplisia yang diekstraksi (kg)	Bobot ekstrak kering (g)	Warna ekstrak	Rendemen (%)
<i>Cinnamomum burmannii</i> (Nees & T.Nees) Blume	Kulit batang	1	320	Coklat	32

Sebanyak 130 g ekstrak kering difraksinasi berturut-turut secara fraksinasi cair-cair dengan pelarut yang kepolarannya meningkat dimulai dari petroleum eter, etil asetat dan n-butanol. Ekstrak kering diencerkan dengan air panas, diaduk terus sampai homogen, kemudian dimasukkan dalam corong pisah, difraksinasi dengan petroleum eter yang jumlahnya sama banyak dengan air. Ekstrak difraksinasi dengan 4x proses fraksinasi sampai diperoleh filtrat yang warnanya pucat pada lapisan petroleum eter. Fraksi petroleum eter dipisahkan, kemudian fraksi air difraksinasi dengan etil asetat dengan 10x proses fraksinasi sampai diperoleh filtrat yang warnanya kurang pekat dari sebelumnya pada lapisan etil

asetat. Fraksi etil asetat dipisahkan, fraksi air difraksinasi dengan n-butanol dengan 8x proses fraksinasi sampai diperoleh filtrat yang warnanya kurang pekat dari sebelumnya pada lapisan n-butanol, sehingga diperoleh fraksi butanol dan fraksi air.

Hasil penyarian masing-masing fraksi dikumpulkan, lalu diuapkan dan diharapkan senyawa-senyawa yang memiliki kepolaran yang sesuai dengan masing-masing pelarut dapat terekstrak secara maksimal pada masing-masing pelarut. Hasil fraksinasi diperoleh 4 ekstrak yaitu ekstrak petroleum eter, ekstrak etil asetat, ekstrak n-butanol dan ekstrak air. Ekstrak petroleum eter berwarna hijau muda sedangkan ekstrak etil asetat, n-butanol dan air berwarna coklat. Hasil fraksinasi 130 g ekstrak kering etanol 80% dengan petroleum eter, etil asetat dan n-butanol diperoleh data pada Tabel 4.3.

**Tabel 4.3.** Hasil fraksinasi serbuk *C. burmannii* Bl.

Pelarut	Volume (L)	Warna ekstrak pekat	Hasil (g)
Petroleum eter	2	Hijau muda	5,2
Etil asetat	5	Coklat	30
n-butanol	4	Coklat	55
Air	0,5	Coklat	20

Berdasarkan tabel tersebut dapat diketahui bahwa berat ekstrak pekat n-butanol menunjukkan nilai yang paling besar. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa-senyawa polar dalam kulit batang kayu manis lebih besar daripada senyawa-senyawa semipolar dan non-polar. Hasil ekstrak pekat pada masing-masing pelarut digunakan untuk uji selanjutnya yaitu uji penghambatan aktivitas  $\alpha$  glukosidase dan identifikasi golongan senyawa dengan menggunakan reagen dan Kromatografi Lapis Tipis.

#### 4.3. Uji Pendahuluan Kondisi Optimum

Hal hal yang mempengaruhi kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim terdiri dari beberapa faktor antara lain konsentrasi substrat, suhu, pH dan waktu inkubasi. Uji pendahuluan yang dilakukan adalah penentuan pH, waktu inkubasi



dan konsentrasi substrat untuk mendapatkan kondisi optimum dalam percobaan. Kondisi optimum yang ingin dicapai adalah kondisi dimana larutan blanko dan sampel dapat menunjukkan serapan sebesar 0,2–0,8. Bila serapan optimum yang dipilih terlalu tinggi, dikhawatirkan ekstrak yang terdapat dalam larutan sampel akan memberi serapan pada panjang gelombang dimana larutan sampel akan diukur, sehingga serapan sampel semakin meningkat dan tidak dapat terbaca oleh spektrofotometer.

Larutan yang diuji terdiri dari campuran DMSO, dapar fosfat, substrat p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG),  $\alpha$ -glukosidase, dan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Dapar fosfat pH 7,0 ditambahkan untuk membuat medium yang memiliki pH optimum enzim sedangkan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ditambahkan untuk menghentikan reaksi enzim.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dipilih sebagai penghenti reaksi sebab mampu meningkatkan pH larutan uji menjadi basa, sehingga enzim akan terdenaturasi. Konsentrasi  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  yang dipilih adalah 200 mM, sebab pada konsentrasi tersebut dicapai pH 13, dimana enzim akan terdenaturasi (Sigma Aldrich, 1996). Konsentrasi substrat yang digunakan pada uji optimasi adalah 10 mM.

Serapan yang diukur adalah serapan larutan blanko dan larutan kontrol blanko. Larutan blanko yaitu larutan uji tanpa ekstrak, sedangkan larutan kontrol blanko, yaitu larutan blanko dengan penambahan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sebelum enzim untuk mengoreksi hasil serapan blanko bila ternyata enzim masih menunjukkan aktivitas setelah penambahan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

#### 4.3.1. Aktivitas konsentrasi enzim

Aktivitas enzim perlu dihitung untuk mengetahui enzim yang digunakan masih memiliki aktivitas atau tidak. Konsentrasi larutan enzim yang digunakan adalah 0,0279 U/mL. Perhitungan aktivitas enzim dilakukan dengan mengukur serapan larutan uji yang merupakan campuran dari 20  $\mu\text{L}$  DMSO, 980  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pH 7,0 dan 500  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) dengan konsentrasi 10 mM. Setelah itu larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit agar suhu larutan mencapai suhu optimum enzim. Kemudian ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan enzim dengan konsentrasi 0,0279 U/mL, lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C agar enzim dapat bereaksi dengan substrat dalam jangka waktu

tersebut. Setelah diinkubasi, larutan diberi 2000  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  200 mM untuk menghentikan reaksi. Kemudian larutan uji diukur besar serapannya dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  400. Berdasarkan perhitungan rumus (3.1) dan (3.2), maka didapatkan aktivitas enzim pada konsentrasi substrat 10 mM adalah sebesar 0,3035 U/mL atau 25,292 U/mg. Aktivitas tersebut memenuhi syarat keaktifan yang tertera pada label enzim, yaitu  $> 10$  U/mg (Sigma Aldrich, 1996).

#### 4.3.2. Penentuan pH optimum

Penentuan optimasi pH dilakukan dengan menggunakan dapar fosfat pada pH 6,8 ; 7,0 dan 7,2 secara berurutan. Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  DMSO ditambahkan dengan 980  $\mu\text{L}$  dapar fosfat dan 500 $\mu\text{L}$  p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) dengan konsentrasi 10 mM, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan enzim dengan konsentrasi 0,0279 U/ml, lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah itu, ditambahkan 2000  $\mu\text{L}$  200 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sebagai penghenti reaksi. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  400 nm.

Peningkatan aktivitas enzim pada pH 6,8 ; 7,0 dan 7,2 berturut-turut adalah 19,300 U/mg; 25,292 U/mg; dan 53,042 U/mg. Berdasarkan hasil yang diperoleh, pH dapar fosfat yang digunakan untuk uji penghambatan terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase adalah pH 7,0 karena menunjukkan serapan sebesar 0,2–0,8. Data serapan dan nilai aktivitas enzim pada uji optimasi pH dapat dilihat pada Tabel 4.11.

#### 4.3.3. Penentuan waktu Inkubasi optimum

Penentuan optimasi waktu inkubasi dilakukan dengan waktu inkubasi 15, 20 dan 30 menit secara berurutan. Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  DMSO ditambahkan dengan 980  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pada pH 7,0 dan 500 $\mu\text{L}$  p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) dengan konsentrasi 10 mM, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan enzim dengan konsentrasi 0,0279 U/mL, lalu diinkubasi pada suhu 37°C. Setelah itu, ditambahkan 2000  $\mu\text{L}$  200 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sebagai penghenti reaksi. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  400 nm.

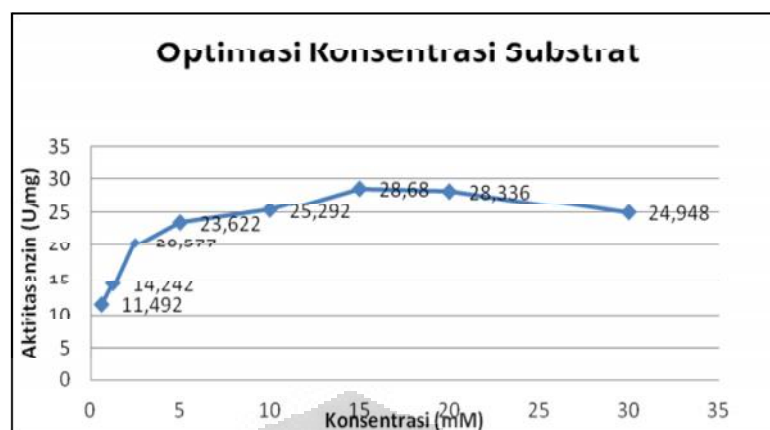
Peningkatan aktivitas enzim pada waktu inkubasi 15, 20 dan 30 menit berturut-turut adalah 25,292 U/mg; 28,767 U/mg; dan 30,425 U/mg. Berdasarkan hasil yang diperoleh, waktu inkubasi yang digunakan untuk uji penghambatan terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase adalah 15 menit karena menunjukkan serapan sebesar 0,2–0,8. Data serapan dan nilai aktivitas enzim pada uji optimasi waktu inkubasi dapat dilihat pada Tabel 4.12.

#### 4.3.4. Penentuan konsentrasi substrat optimum

Penentuan konsentrasi substrat optimum dilakukan dengan mengukur serapan larutan uji yang terdiri dari 20  $\mu$ L DMSO, 980  $\mu$ L dapar fosfat pH 7,0 dan 500  $\mu$ L larutan substrat dengan konsentrasi 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM dan 30 mM secara berurutan. Setelah itu larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit agar suhu larutan mencapai suhu optimumnya yaitu 37°C, kemudian ditambahkan 500  $\mu$ L larutan enzim dengan konsentrasi 0,0279 U/mL, lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah itu diberi 2000  $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> untuk menghentikan reaksi. Kemudian larutan uji diukur besar serapannya dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  400 nm.

Serapan hasil uji yang diperoleh pada tiap konsentrasi substrat kemudian dihitung aktivitas enzimnya. Peningkatan aktivitas enzim terjadi pada konsentrasi substrat 0,625 mM sampai 15 mM, dengan aktivitas enzim berturut-turut 11,492 U/mg; 14,242 U/mg; 20,577 U/mg; 23,622 U/mg ; 25,292 U/mg dan 28,680 U/mg. Kemudian aktivitas enzim menurun pada konsentrasi substrat 20 mM dan 30 mM dengan aktivitas enzim 28,336 U/mg dan 24,948 U/mg. Kurva hasil uji optimasi konsentrasi substrat dapat dilihat pada gambar 4.1.

Penurunan aktivitas ini disebabkan karena terbentuknya produk inhibitor dari reaksi enzim. Produk inhibitor tersebut adalah  $\alpha$ -D-glukosa dan p-nitrofenil. Produk inhibitor tersebut dapat menghambat aktivitas enzim karena kedua produk tersebut memiliki kemiripan struktur dengan substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida. Berdasarkan hasil aktivitas enzim yang diperoleh, konsentrasi substrat yang digunakan untuk uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase adalah 15 mM.



**Gambar 4.1.** Kurva hasil uji optimasi konsentrasi substrat

Konsentrasi substrat yang menghasilkan aktivitas enzim optimal akan digunakan pada uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase. Data konsentrasi, serapan dan nilai aktivitas enzim pada uji optimasi konsentrasi substrat dapat dilihat pada Tabel 4.13.

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

Larutan yang digunakan pada uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase adalah larutan blanko dan kontrol blanko, larutan akarbose sebagai pembanding, larutan kontrol akarbose, serta larutan sampel dan kontrol sampel.

Larutan blanko yaitu larutan uji tanpa ekstrak, sedangkan larutan kontrol blanko, yaitu larutan blanko dengan penambahan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sebelum enzim pada saat inkubasi untuk mengoreksi hasil serapan blanko bila ternyata enzim masih menunjukkan aktivitas setelah penambahan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Larutan akarbose terdiri dari 4 konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi akarbose yang digunakan adalah 0,125%; 0,25%; 0,5%; dan 1%, sedangkan larutan kontrol akarbose, yaitu larutan akarbose dengan penambahan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sebelum enzim pada saat inkubasi untuk mengoreksi hasil serapan larutan uji bila ternyata enzim masih menunjukkan aktivitas setelah penambahan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Larutan sampel *C.Burmannie* dibuat dengan 4 konsentrasi yang berbeda pada tiap fraksi. Konsentrasi fraksi ekstrak yang digunakan adalah 0,125%; 0,25%; 0,5%; dan 1%, Sedangkan larutan kontrol sampel yaitu larutan sampel dengan penambahan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sebelum enzim pada saat inkubasi. Alasan

diperlukan kontrol sampel adalah untuk mengoreksi hasil serapan sampel bila ternyata enzim masih menunjukkan aktivitas setelah penambahan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Selain itu, larutan ekstrak *C.Burmanniei* berwarna sehingga memberikan nilai serapan pada panjang gelombang pengukuran yang digunakan.

Pengujian dilakukan sebanyak dua kali (duplo) pada masing-masing larutan uji. Dari hasil pengujian tersebut akan diperoleh data serapan untuk menghitung nilai % inhibisi dari perhitungan rumus (3.3) dan  $\text{IC}_{50}$  dari perhitungan rumus (3.4). Nilai  $\text{IC}_{50}$  akarbose dan fraksi ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.4. sebagai berikut.

**Tabel 4.4.** Nilai  $\text{IC}_{50}$  larutan uji

No	Sampel	$\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL})$
1	Akarbose	235,05
2	Ekstrak petroleum eter	69,717
3	Ekstrak etil asetat	19,239
4	Ekstrak n-butanol	1,168
5	Ekstrak air	24,244

Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.14 sampai dengan Tabel 4.18. Dari Tabel 4.4 dapat dilihat bahwa nilai  $\text{IC}_{50}$  akarbose sebagai standar pembanding adalah sebesar 235,05  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai  $\text{IC}_{50}$  akarbose yang diperoleh dalam penelitian ini tidak jauh berbeda dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  akarbose yang diperoleh pada penelitian lain oleh Narkhede *et al.* (2011) yaitu sebesar 325.50  $\mu\text{g/mL}$ , sehingga nilai tersebut dapat dijadikan acuan untuk menentukan fraksi ekstrak tanaman yang tergolong memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase. Fraksi ekstrak *C.Burmanniei* yang memiliki aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase ditentukan berdasarkan nilai  $\text{IC}_{50}$  yang lebih rendah dari akarbose sebagai pembanding. Fraksi ekstrak tersebut adalah ekstrak petroleum eter, ekstrak etil asetat, ekstrak n- butanol, dan ekstrak air.

$\alpha$ -Glukosidase yang digunakan berasal dari *Saccharomyces cerevisiae*. Tingginya nilai  $IC_{50}$  akarbose kemungkinan disebabkan oleh kurangnya sensitifitas akarbose terhadap  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari bakteri dan ragi, akarbose lebih efektif dalam menghambat  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari mamalia, seperti sukrase dan maltase (Shinde *et al.*, 2008). Hal lain yang mungkin menjadi penyebab tingginya nilai  $IC_{50}$  akarbose bila dibandingkan dengan ekstrak lain adalah, akarbose adalah senyawa murni sedangkan sampel yang diuji masih berupa ekstrak kasar, sehingga dalam larutan ekstrak terdapat lebih dari satu senyawa inhibitor yang dapat menyebabkan daya inhibisi lebih tinggi.

#### 4.5. Uji Kinetika Enzim

Uji kinetika enzim dilakukan untuk menentukan jenis penghambatan yang dimiliki fraksi ekstrak. Pengujian dilakukan dengan menggunakan 4 konsentrasi ekstrak yang berbeda untuk memperoleh titik dalam grafik *Lineweaver-Burk* dan 4 konsentrasi substrat yang berbeda untuk mengetahui bagaimana pengaruh konsentrasi substrat pNPG terhadap reaksi enzim. Uji kinetika dilakukan pada fraksi ekstrak yang memiliki penghambatan terbaik yang dilihat dari nilai  $IC_{50}$  yang rendah. Dalam penelitian ini, dipilih ekstrak n-butanol yang memiliki  $IC_{50}$  sebesar 1,168  $\mu\text{g/mL}$  untuk dilakukan uji kinetika enzim.

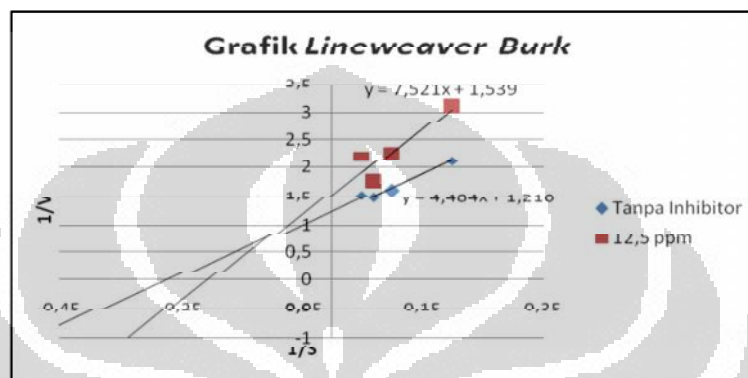
Pada uji kinetika ekstrak n-butanol, konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 6,27 ppm, 12,55 ppm, 25,10 ppm, dan 50,20 ppm. Konsentrasi substrat yang digunakan adalah 5 mM, 10 mM, 15 mM, dan 20 mM. Data serapan uji kinetika selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.19 sampai dengan Tabel 4.21.

Dari data serapan yang diperoleh, dengan menggunakan persamaan regresi linear dimana  $1/S$  sebagai sumbu x dan  $1/V$  sebagai sumbu y, akan diperoleh tetapan *Michaelis-Menten* ( $K_m$ ) pada masing-masing konsentrasi menggunakan rumus (3.6) dan nilai  $V_{max}$  menggunakan rumus (3.7). Hasil perhitungan tetapan *Michaelis-Menten* dan nilai  $V_{max}$  dapat dilihat pada Tabel 4.5., sedangkan Grafik kinetika inhibisi enzim dapat dilihat di gambar 4.2.

**Tabel 4.5** Nilai tetapan *Michaelis-Menten*

Sampel	a	b	Km	Vmax
V <sub>0</sub>	1,210	4,484	3,706	0,826
V <sub>1</sub>	1,539	7,521	4,887	0,650

Keterangan : V<sub>0</sub> = blangko (tanpa inhibitor), V<sub>1</sub> = konsentrasi sampel 12,5 ppm

**Gambar 4.2.** Grafik *Lineweaver-Burk* pada uji kinetika

Dari Gambar 4.2, dapat dilihat bahwa grafik *Lineweaver-Burk* tidak menunjukkan perpotongan di sumbu x maupun sumbu y, namun perpotongan terjadi pada daerah sebelah kiri sumbu y, grafik tersebut serupa dengan grafik jenis penghambatan kompetitif campuran. Selain itu, dari hasil perhitungan nilai Km dan Vmax pada Tabel 4.5, nilai Km terlihat meningkat dengan adanya peningkatan konsentrasi inhibitor, dan nilai Vmax menurun dengan adanya peningkatan konsentrasi inhibitor, sehingga kemungkinan jenis penghambatan yang terjadi adalah kompetitif campuran. Hasil kompetitif campuran ini dapat disebabkan karena ekstrak yang digunakan berupa ekstrak kasar, sehingga terdapat lebih dari satu senyawa aktif yang mempunyai jenis penghambatan yang berbeda.

#### 4.6. Identifikasi Golongan Senyawa

Identifikasi golongan senyawa pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa dari fraksi aktif pada kulit batang kayu manis yang dilakukan terhadap golongan terpen, alkaloid, saponin, flavonoid, glikosida,

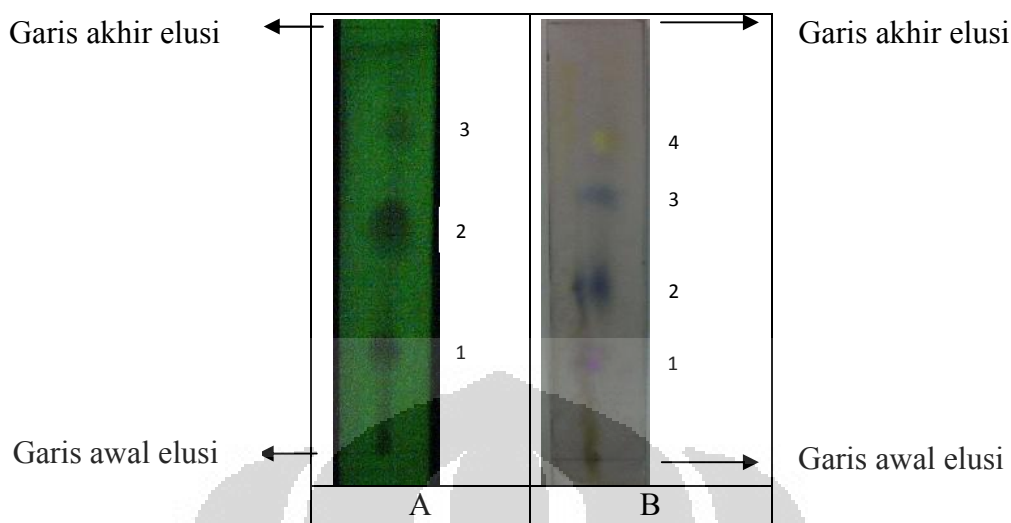
antrakuinon dan tanin. Identifikasi dilakukan dengan uji reagen dan untuk memastikan informasi yang didapat dari uji reagen, maka dilakukan uji KLT.

#### 4.3.1. Terpen

Pada identifikasi golongan terpen, pereaksi Liebermann Burchard yang terdiri dari gabungan antara asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (2:1) akan bereaksi dengan inti steroid pada terpen membentuk warna (Fransworth, 1966). Ekstrak yang menunjukkan hasil positif adalah ekstrak petroleum eter dengan terbentuknya warna ungu kebiruan, sedangkan hasil pengujian pada ekstrak etil asetat, n-butanol dan air tidak menunjukkan adanya terpen.

Selanjutnya, terpen diidentifikasi dengan KLT menggunakan eluen benzen-kloroform (3:7). Golongan senyawa terpen hasil KLT setelah disemprot dengan reagen vanilin- $H_2SO_4$  ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna (Harborne, 1987 ; Wagner, 1984). Pola kromatogram yang dihasilkan setelah disemprot dengan vanilin- $H_2SO_4$  terdiri dari 4 noda. Noda ke 1 berwarna ungu, noda ke 2 berwarna ungu tua, noda ke 3 ungu dan noda ke 4 berwarna kuning. Nilai Rf noda ke 1 sampai 4 adalah 0,22 ; 0,40 ; 0,64 ; 0,87. Hasil identifikasi golongan senyawa terpen pada ekstrak petroleum eter dengan menggunakan eluen benzene-kloroform (3:7) ditunjukkan pada Gambar 4.3 sedangkan nilai Rf noda dapat dilihat pada tabel 4.6.





Keterangan: (a) hasil pengamatan dengan lampu UV 254 nm (b) hasil elusi setelah disemprot reagen vanilin- $\text{H}_2\text{SO}_4$

**Gambar 4.3.** Hasil KLT senyawa terpen pada ekstrak petroleum eter dengan eluen benzene-kloroform (3:7)

**Tabel 4.6.** Hasil KLT senyawa terpen pada ekstrak petroleum eter dengan eluen benzene-kloroform (3:7)

No noda	Warna noda dengan lampu UV 254 nm	Rf tiap noda	Warna noda setelah disemprot vanilin- $\text{H}_2\text{SO}_4$	Rf tiap noda
1	Ungu	0,22	Ungu muda	0,22
2	Ungu	0,53	Ungu tua	0,40
3	Ungu	0,87	Ungu	0,64
4	-		Kuning	0,87

#### 4.3.2. Alkaloid

Uji adanya senyawa alkaloid dengan cara memasukkan sedikit ekstrak sampel pada tabung reaksi, kemudian ditambahkan pelarut air dan HCl (9:1). Tujuan penambahan HCl adalah untuk menetralkan alkaloid karena alkaloid bersifat basa sehingga ditambah dengan pelarut yang bersifat asam. Senyawa alkaloid pada tanaman umumnya ditemukan dalam bentuk garam yang bersifat larut air (Fransworth, 1966).

Secara kualitatif untuk menunjukkan adanya alkaloid dapat diperoleh dengan menggunakan reagen Mayer, Dragendorff dan Bouchardat. Dengan penambahan pereaksi tersebut, alkaloid akan bereaksi dengan ion logam sehingga membentuk endapan (Fransworth, 1966). Endapan terbentuk karena adanya pembentukan kompleks antara ion logam dari pereaksi yang digunakan dengan senyawa alkaloid. Hasil pengujian pada keempat ekstrak yaitu petroleum eter, etil asetat, n-butanol dan air tidak menunjukkan adanya alkaloid dalam keempat ekstrak kulit batang kayu manis tersebut.

#### 4.3.3. Saponin

Pengujian saponin dilakukan dengan uji busa yaitu dengan penambahan air ke dalam ekstrak kemudian dikocok selama 1 menit. Adanya saponin ditunjukkan oleh timbulnya busa yang bertahan selama 10 menit. Pengocokan ekstrak dengan air panas dilakukan dengan tujuan untuk menghasilkan busa yang stabil, sebab saponin merupakan senyawa aktif permukaan yang dapat membentuk busa (Harborne, 1987). Ekstrak yang memberikan hasil positif adalah ekstrak n-butanol dan air. Ekstrak tersebut mampu menghasilkan busa dengan tinggi 2,3 cm dan 1,5 cm setelah pengocokan dengan air suling panas dan tetap stabil setelah diberi penambahan asam encer. Ekstrak yang tidak memberi hasil positif adalah ekstrak petroleum eter dan etil asetat. Ekstrak petroleum eter tidak menghasilkan busa sedangkan ekstrak etil asetat hanya menghasilkan busa setinggi 0,2 cm dan busa tidak stabil setelah penambahan asam encer. Hasil yang negatif kemungkinan disebabkan karena konsentrasi saponin yang tertarik selama proses fraksinasi sangat kecil atau tidak ada sama sekali.

#### 4.3.4. Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan melarutkan ekstrak dengan etanol 96% kemudian ditambah serbuk Mg dan HCl pekat untuk melihat terbentuknya warna merah sampai hijau (Fransworth, 1966). Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya flavon, warna jingga menunjukkan adanya flavanol, dan warna hijau menunjukkan adanya aglikon (Fransworth, 1966). Ekstrak yang menunjukkan hasil positif pada pereaksi tersebut di antaranya adalah ekstrak butanol dan

ekstrak air yang memberi warna merah, serta ekstrak etil asetat yang memberikan memberikan warna jingga. Pengujian berikutnya dilakukan dengan penambahan serbuk Zn dan HCl pekat untuk melihat terbentuknya warna merah sebagai indikator positif. Ekstrak yang menunjukkan hasil positif pada pereaksi tersebut di antaranya adalah ekstrak etil asetat, n-butanol dan ekstrak air yang memberi warna merah. Pengujian terhadap golongan flavonoid juga dilakukan dengan melihat adanya fluoresensi kuning-hijau pada 366 nm setelah penambahan asam borat dan asam oksalat pada larutan ekstrak kental dalam eter. Ekstrak yang menunjukkan hasil positif pada pereaksi tersebut di antaranya adalah ekstrak etil asetat, n-butanol dan ekstrak air.

Selanjutnya flavonoid diidentifikasi menggunakan KLT. Golongan senyawa flavonoid hasil KLT setelah dideteksi di bawah lampu UV 254 menunjukkan warna biru gelap sedangkan di bawah lampu UV 366 menunjukkan warna kuning, biru dan hijau (Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984).

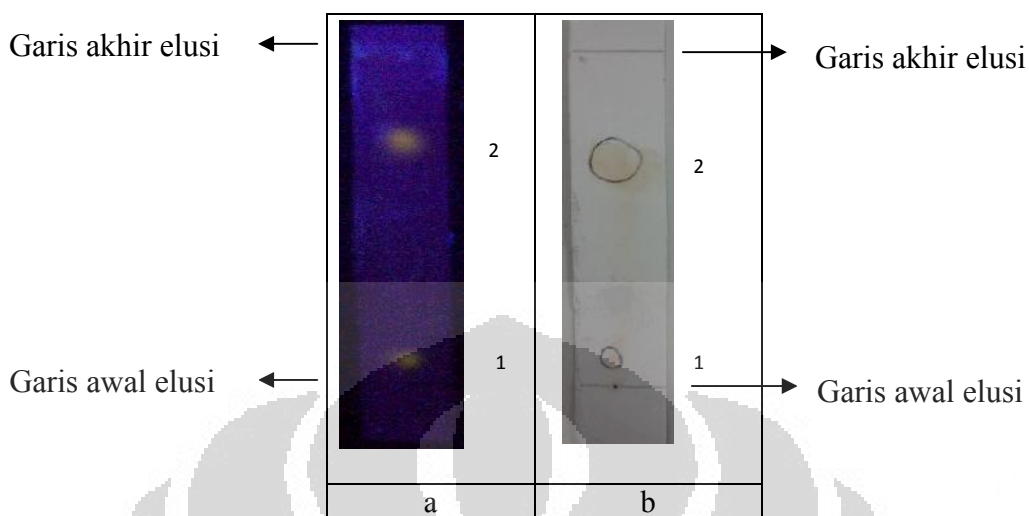
Hasil KLT ekstrak etil asetat dengan lampu UV 366 nm ditunjukkan dengan terbentuknya 2 noda yang berwarna kuning lemah, nilai Rf yang dihasilkan adalah 0,09 dan 0,74. Ketika di semprot dengan reagen  $AlCl_3$  1% ditunjukkan dengan terbentuknya 2 noda yang berwarna kuning lemah, dengan nilai Rf yang dihasilkan adalah 0,09 dan 0,70.

Hasil KLT ekstrak n-butanol dengan lampu UV 366 nm ditunjukkan dengan terbentuknya 3 noda yang berwarna kuning lemah, nilai Rf yang dihasilkan adalah 0,15 ; 0,33 ; 0,68. Ketika di semprot dengan reagen  $AlCl_3$  1% ditunjukkan dengan terbentuknya 3 noda yang berwarna kuning, dengan nilai Rf yang dihasilkan adalah 0,11 ; 0,30 ; 0,68.

Hasil KLT ekstrak air dengan lampu UV 366 nm ditunjukkan dengan terbentuknya 2 noda yang berwarna kuning, nilai Rf yang dihasilkan adalah 0,70 dan 0,89. Ketika di semprot dengan reagen  $AlCl_3$  1% ditunjukkan dengan terbentuknya 2 noda yang berwarna kuning lemah, dengan nilai Rf yang dihasilkan adalah 0,75 dan 0,89.

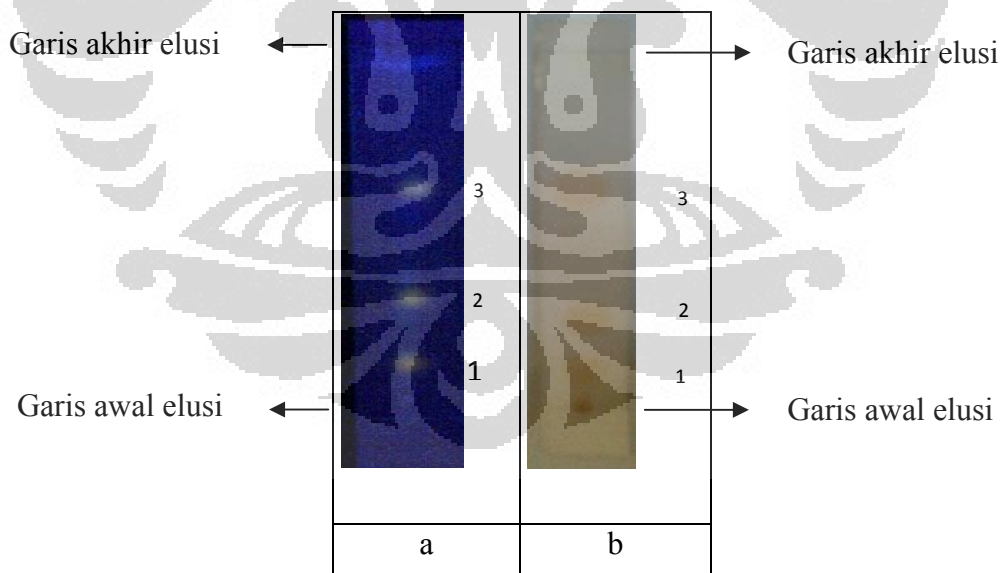
Hasil identifikasi golongan senyawa flavonoid pada ekstrak etil asetat, dengan menggunakan eluen heksan-etil asetat (7 : 3) serta ekstrak n-butanol dan air dengan menggunakan eluen n-butanol-asam asetat-air (4 :1 :5) ditunjukkan

pada Gambar 4.4. sampai 4.6. sedangkan nilai Rf noda dapat dilihat pada tabel 4.7 sampai 4.9.



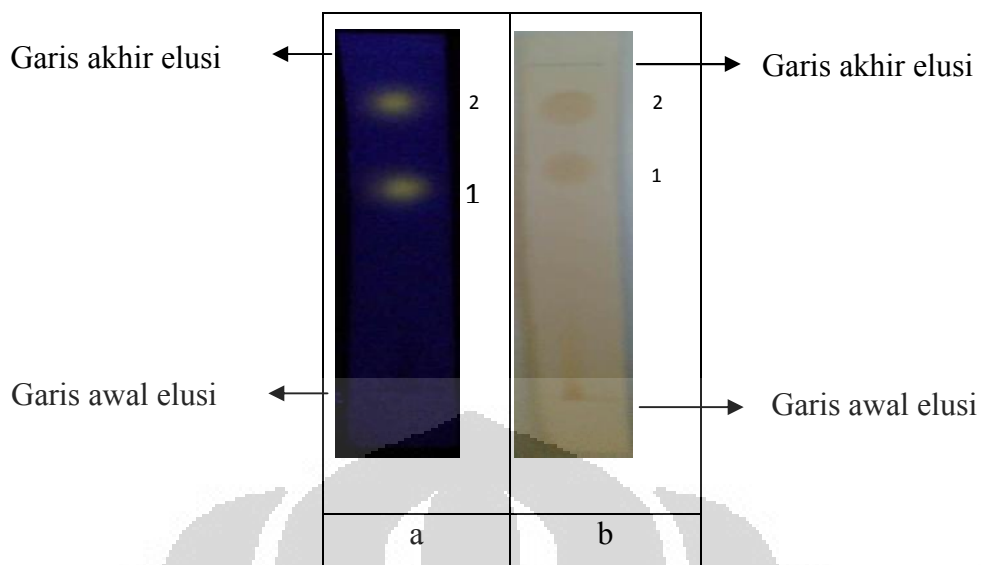
Keterangan: (a) hasil pengamatan ekstrak etil asetat dengan lampu UV 366 nm (b) hasil elusi ekstrak etil asetat setelah disemprot reagen AlCl<sub>3</sub>.

**Gambar 4.4.** Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak etil asetat dengan eluen heksan - etil asetat (7 : 3)



Keterangan: (a) hasil pengamatan ekstrak n-butanol dengan lampu UV 366 nm, (b) hasil elusi ekstrak n-butanol setelah disemprot reagen AlCl<sub>3</sub>.

**Gambar 4.5.** Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak n-butanol dengan eluen n-butanol - asam asetat - air (4 : 1 : 5)



Keterangan: (a) hasil pengamatan ekstrak air dengan lampu UV 366 nm, (b) hasil elusi ekstrak air setelah disemprot reagen  $\text{AlCl}_3$

**Gambar 4.6.** Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak air dengan eluen n-butanol - asam asetat - air (4 : 1 : 5)

**Tabel 4.7.** Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak etil asetat dengan eluen heksan-etil asetat (7 : 3)

No noda	Warna noda pada lampu UV 366 nm	Rf tiap noda	Warna noda setelah disemprot $\text{AlCl}_3$	Rf tiap noda
1	Kuning lemah	0,09	Kuning lemah	0,09
2	Kuning lemah	0,74	Kuning lemah	0,70

**Tabel 4.8.** Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak n-butanol dengan eluen n-butanol - asam asetat - air (4 : 1 : 5)

No noda	Warna noda pada lampu UV 366 nm	Rf tiap noda	Warna noda setelah disemprot $\text{AlCl}_3$	Rf tiap noda
1	Kuning lemah	0,15	Kuning	0,11
2	Kuning lemah	0,33	Kuning	0,30
3	Kuning lemah	0,68	Kuning	0,68

**Tabel 4.9.** Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak air dengan eluen n-butanol - asam asetat - air (4 : 1: 5)

No noda	Warna noda pada lampu UV 366 nm	Rf tiap noda	Warna noda setelah disemprot $AlCl_3$	Rf tiap noda
1	Kuning	0,70	Kuning lemah	0,75
2	Kuning	0,89	Kuning lemah	0,89

#### 4.3.5. Glikosida

Dilakukan dengan melarutkan ekstrak dalam HCl 10% dan dipanaskan agar glikosida terhidrolisis menjadi bentuk glikon dan aglikon. Kemudian larutan disari dengan eter untuk memisahkan senyawa non polar (Fransworth, 1966), lalu bagian yang polar diidentifikasi dengan reaksi Molisch. Hasil pengujian pada ekstrak etil asetat, n-butanol dan air menunjukkan hasil positif, dengan terbentuknya cincin ungu setelah penambahan pereaksi Molisch LP dengan  $H_2SO_4$  pekat.

#### 4.3.6. Antrakuinon

Golongan antrakuinon diidentifikasi dengan reaksi Borntrager, yaitu terbentuknya filtrat benzen berwarna kuning dan lapisan air berwarna merah dengan pengocokkan NaOH 2N (Fransworth, 1966). Hasil pengujian pada keempat ekstrak yaitu petroleum eter, etil asetat, n-butanol dan air tidak menunjukkan adanya antrakuinon pada keempat fraksi ekstrak kulit batang kayu manis tersebut.

#### 4.3.7. Tanin

Identifikasi tanin dapat dilakukan dengan menambahkan ekstrak dengan larutan  $FeCl_3$  dan yang kedua adalah dengan menggunakan gelatin, jika terbentuk endapan putih pada ekstrak maka senyawa tersebut mengandung tanin.

Uji fitokimia dengan menggunakan  $FeCl_3$  digunakan untuk menentukan apakah suatu bahan atau sampel mengandung gugus fenol. Dugaan adanya gugus fenol ditunjukkan dengan warna biru, biru hitam, hijau, biru hijau, sehingga

apabila uji fitokimia dengan  $\text{FeCl}_3$  memberikan hasil positif dimungkinkan dalam suatu sampel terdapat suatu senyawa fenol dan dimungkinkan salah satunya adalah tanin karena tanin merupakan senyawa polifenol. Ekstrak etil asetat, n-butanol dan air menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya warna hijau kebiruan.

Pengujian tanin dengan penambahan gelatin 10% dan larutan gelatin 1% dalam larutan NaCl 10% untuk memeriksa adanya endapan, sebab kopolimer tidak larut air (Fransworth, 1966). Tanin merupakan polifenol yang dapat bereaksi dengan protein membentuk endapan. Ekstrak n-butanol dan air menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya endapan putih.

Kesimpulan hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 4.10. sebagai berikut.

**Tabel 4.10.** Kesimpulan hasil identifikasi golongan senyawa pada ekstrak kayu manis

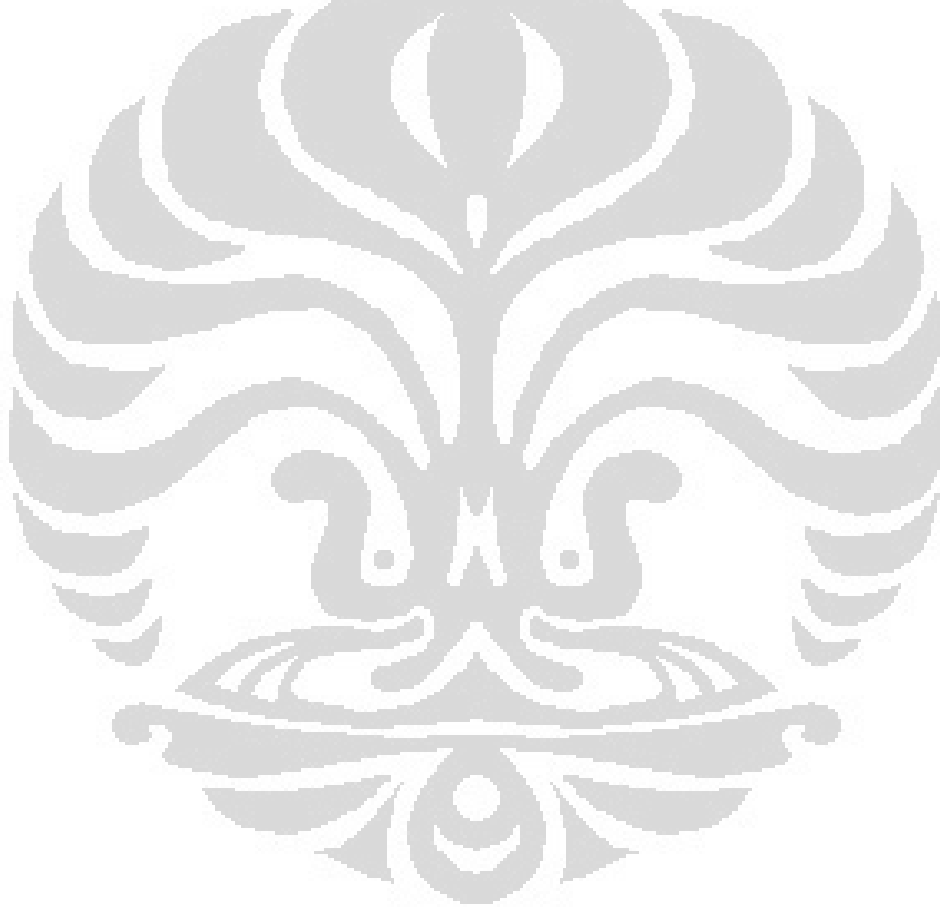
No.	Golongan senyawa	Ekstrak Petroleum eter	Ekstrak Etil asetat	Ekstrak n-butanol	Ekstrak Air
1.	Alkaloid	-	-	-	-
2.	Glikosida	-	+	+	+
3.	Saponin	-	-	+	+
4.	Flavonoid	-	+	+	+
5.	Tanin	-	-	+	+
6.	Antrakuinon	-	-	-	-
7.	Terpen	+	-	-	-

Hasil identifikasi golongan senyawa selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.22. sampai dengan Tabel 4.28.

Hasil identifikasi fitokimia menunjukkan adanya komponen fenol dan metabolit sekunder lainnya seperti terpen yang terdapat dalam ekstrak. flavonoid dan glikosida adalah komponen terbesar yang terdapat dalam ekstrak kayu manis.

Dari hasil identifikasi golongan senyawa, dapat diperoleh informasi bahwa ada hubungan antara komponen fenol yang terdapat dalam ekstrak kayu manis dengan kemampuan penghambatan aktivitas  $\alpha$  glukosidase.

Ekstrak n-butanol merupakan ekstrak dengan penghambatan tertinggi mengandung golongan senyawa flavonoid, glikosida dan tanin. Suatu laporan penelitian tentang penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dari tanaman obat menunjukkan bahwa golongan flavonoid dan glikosida serta tanin terkondensasi memiliki kemampuan sebagai penghambat  $\alpha$ -glukosidase (Shihabudeen, Priscilla & Thirumurugan, 2011; Adisakwattana, 2011).





## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

- a. Hasil uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase menunjukkan bahwa keempat ekstrak kulit batang kayu manis menunjukkan penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase.
- b. Fraksi ekstrak yang memiliki penghambatan terbaik terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase adalah ekstrak n-butanol dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 1,168  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai  $IC_{50}$  ekstrak etil asetat, air dan petroleum eter adalah 19,239  $\mu\text{g/mL}$ , 24,244  $\mu\text{g/mL}$ , dan 69,717  $\mu\text{g/mL}$ .
- c. Ekstrak n-butanol yang memiliki aktivitas penghambat  $\alpha$ -glukosidase mengandung golongan senyawa flavonoid, glikosida dan tanin.

#### 5.2. Saran

- a. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi masing-masing senyawa yang terdapat dalam fraksi n-butanol agar identitas dan sifat fisiko kimia senyawa yang menunjukkan penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dapat diketahui.
- b. Selanjutnya penelitian ini perlu diteruskan dengan uji *in vivo*, serta uji klinik agar diketahui efek farmakologi dari senyawa aktif yang terdapat pada fraksi n-butanol sehingga memenuhi syarat sebagai obat.

## DAFTAR ACUAN

- 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  $\alpha$ -glucosidase and Pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Plant Foods for Human Nutrition* 66:143–148.
- Anderson, R.A. *et al.* (2004) Isolation and Characterization of Polyphenol Type-A Polymers from Cinnamon with Insulin-like Biological Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 65–70.
- Anderson, R.A. (2008) Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity. *Proceedings of the Nutrition Society* 67: 48–53.
- Asean (2004) *Standard of Asean Herbal Medicines*. Jakarta: Asean countries. Hal : 47-53.
- Bösenberg, L.H (2008) The mechanism of action of oral antidiabetic drugs: a review of recent literature. *The Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa*, 13 (3) : 80-88.
- B POM RI (2009) *Manfaat Yang Berguna Dari Kayu Manis*. Naturakos. IV(11) : 10-11.
- Bradley, P (2006) *British Herbal Compendium*. Bournemouth: British Herbal Medicine Association. Hal : 108.
- Catherine, U., and Seamon, E. (2010) *Natural Standard Herbal Pharmacotherapy : An Evidence-Based approach*. Canada: Mesby elsevier. Hal : 224.
- Cetto, A.A., Jimenez, J.B. & Vazquez R.C. (2007) Alfa-Glycosidase Inhibiting Activity of Some Mexican Plants Used in The treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 116: 27–32.
- Champe, P.C., Harvey, R.A. & Ferrier D.R. (2005) *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. New York: Lippincott Williams & wilkins.
- Chiasson J.L., Josse., R.G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M (2003) Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: The STOP-NIDDM trial. *Journal of American Medical Association* 290:486–494.

- Corwin, E.J (2008) *Handbook of Pathophysiology 3<sup>rd</sup> edition*. USA: Lippincott Williams & Wilkins. Hal : 624-630.
- Dalimartha, S (2009) *Atlas Tumbuhan Obat Jilid VI*. Jakarta: Puspa Swara. Hal : 49-51.
- Depkes (1977) *Materia Medika Indonesia Jilid I*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Depkes (1995) *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Diabetes Melitus Dapat Dicegah*. November 14, 2010. <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1314-diabetes-melitus-dapat-dicegah.html> , diakses 30 Agustus 2011
- Dewi, R.T. *et al* (2007) Penghambatan Effect of Koji *Aspergillus terreus* on  $\alpha$ -Glucosidase activity and Postprandial Hyperglycemia. *Pakistan Journal of Biological Science* Vol. 10 (18) : 3131-3135.
- Dipiro, J.T., Talbert, R.L., Yees, G.C., Matzke, G.R., Wells, B.G, & Posey, L.M.(2005).*Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach (6th ed.)*. New York: McGraw-Hill.
- Dirjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan (2005) *Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Diabetes Melitus*. Jakarta. Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan DEPKES RI. Hal : 10-11.
- Dugoua J.J., Seely, D., Perri, D., Cooley, K., Forelli, T., Mills, E., Koren,G. (2007) From type 2 diabetes to antioxidant activity: A systematic review of the safety and efficacy of common and cassia cinnamon bark. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 85:837–847.
- EISAI (1995) *Medicinal Herbs Index in Indonesia*. Jakarta: PT. EISAI Indonesia.
- Farnsworth, N.R (1966) Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Science* 55, 3, 226-276.
- Farmakope Indonesia edisi III* (1979) Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Frandsen, T.P., Palcic, M.M., Svensson, B. (2002) Substrate recognition by three family 13 yeast  $\alpha$ -glucosidases. *European Journal of Biochemistry* 269 (2) 728-734
- Ganong, W.F (1996) *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 15. Terjemahan Oleh* : Petrus Andrianto. EGC. Jakarta, Indonesia.
- Ganiswarna, S.G., dkk (2004) *Farmakologi dan terapi*. Edisi IV. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta: UI Press. Halaman 476-480.
- Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.K., Jamaluddin, K., Awasthi, M.K., and Sarsaiya, S (2010) Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal SolidWaste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. *Biotechnology Research International*. Vol 11 : 1-8.
- Harborne, J.B (1987) *Metode Fitokimia. Ter. Dari Phytochemical Methods oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro*. Bandung: Penerbit ITB.
- Harmita (2006) *Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- Hongxiang, H., Tang, G & Liang W.G.V (2009) Chinese Medicine:Hypoglycemic Herbs and Their Action Mechanisms. *BioMed Central*. 4 (11): 1-11
- Heyne, K (1987) *Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid II. Terjemahan Oleh* : Badan Litbang Kehutanan. Yayasan sarana wana jaya, Jakarta, Indonesia, hal 795.
- Jarald, E., Joshi, S.B., Chain, D.C (2008) Diabetes and Herbal Medicines. *Irian Journal Of Pharmacology & Therapeutics*. 7 (1) : 97-106.
- Katzung, B.G. (2006) *Basic And Clinical Pharmacology 10<sup>th</sup> edition*, San Francisco: Mc Graw Hill. Hal 1282.
- Lee S.K. *et al.* (2007) Inhibitory activity of *Euonymus alatus* against alpha-glucosidase in vitro and in vivo. *Nutrition Research and Practice*. 1(3):184-188.
- Marin, D., Linde, D., and Lobato, M.F (2006) Purification and biochemical characterization of an  $\alpha$ -glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Wiley Inter Science Journals* 23: 117–125.

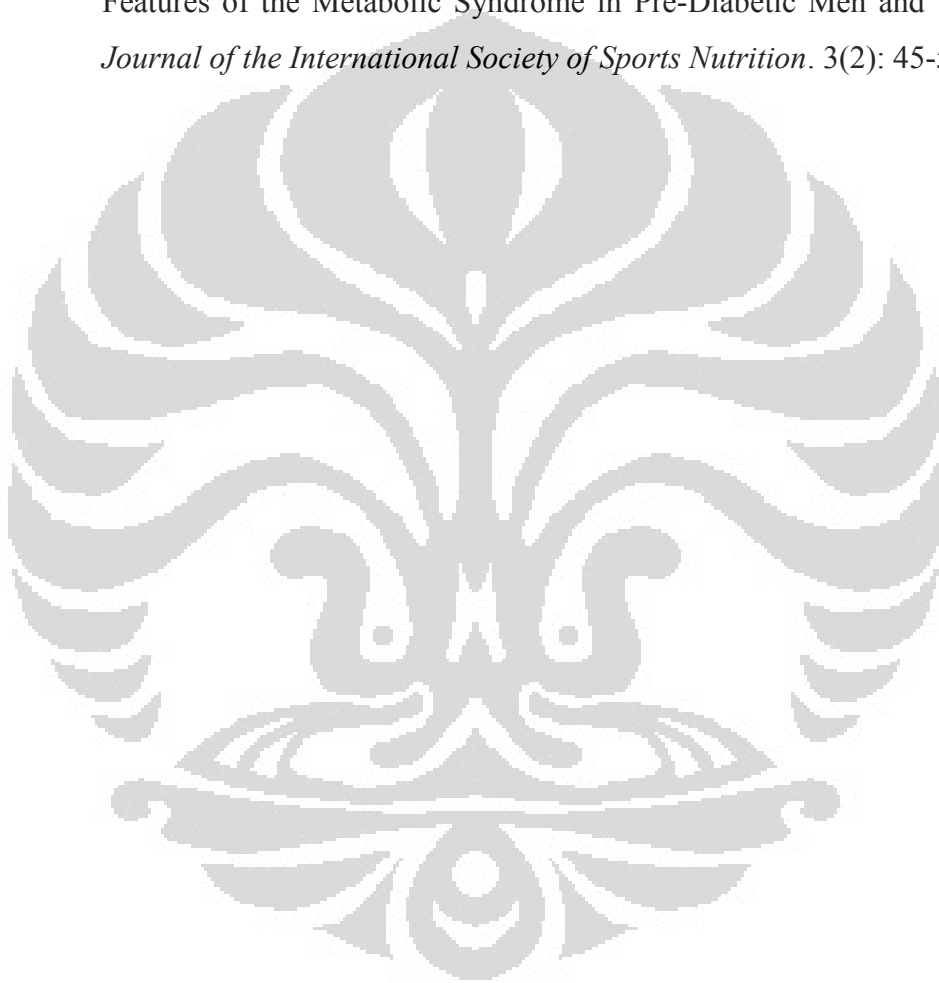
- Markham, K.R. (1988) *Cara Mengidentifikasi Flavonoid. Terjemahan Oleh Kosasih padmawinata*. Bandung: ITB. Hal 1, 15.
- Mauldina, M.G (2011) Penapisan Aktivitas Penghambatan Enzim Alfa-Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Pada Beberapa Tanaman Yang Secara Tradisional digunakan Sebagai Antidiabetes. Depok: Program Sarjana, Universitas Indonesia.
- McPherson, R.A. & Pincus, M.R (2007) *Henry's Clinical Diagnosis and Management By Laboratory Methods* (21<sup>st</sup> ed). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Rodwell, V.W. (2006) *Harper's Illustrated Biochemistry 27<sup>th</sup> Edition*. New York: Mc Graw Hill.
- Narkhede, M.B., Ajimire, P.V., Wagh, A.E., Mohan, M. and Shivashanmugam, A.T. (2011) In vitro antidiabetic activity of *Caesalpinia digyna* (R.) methanol root extract. *Asian Journal of Plant Science and Research* 1 (2): 101-106.
- Ping, H., Zhang, G., Ren, G (2010) Antidiabetic effects of cinnamon oil in diabetic KK-Ay mice. *Food and Chemical Toxicology*. 48:2344–2349.
- Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat* (2000) Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal 10-11.
- Ravindran, P.N., Babu, K.N., Shylaja, M (2004) *Cinnamon and Cassia : The genus Cinnamomum*. USA: CRC Press. Hal 185-195.
- Samuelsson, G (1999) *Drugs of Natural Origin, a Text Book of Pharmacognosy*. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press.
- Setiadi dan Sarwono. (2007). *Tanaman Obat Keluarga*. Jakarta: Samindra Utama. Hal : 6.
- Shihabudeen, H.M.H., Priscilla, D.H. & Thirumurugan, K (2011) Cinnamon extract inhibits  $\alpha$ -glucosidase activity and dampens postprandial glucose excursion in diabetic rats. *Nutrition & Metabolism* 8:46.
- 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. *Carbohydrate Research* . Volume 343: 1278–1281.
- Sigma-Aldrich. (1996). *Sigma Quality Control Test Procedure Enzymatic Assay of  $\alpha$ -Glucosidase*. September 15, 2011. <http://www.sigma-aldrich.com>.
- Starr, F., Starr, K and Loope, L (2003) *Cinnamomum burmannii*. United States Geological Survey-Biological Resources Division. (<http://www.hear.org/starr/hiplants/reports/pdf/cinnamomumburmannii.pdf>, diakses 9 September 2011).
- Storey, K. B. (2004) *Functional Metabolism : Regulation and Adaptation*. New Jersey: Wiley-Liss Inc.
- Sugiwati, S., Setiasi, S., Afifah, E. (2009) Antihyperglycemic Activity of The Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (scheff.) boerl.] Leaf Extracts as an Alpha-glucosidase Penghambat. *Makara Kesehatan*, 13 (2) : 74-78.
- Tjay, T. H., dan Rahardja, K (2007) *Obat-Obat Penting: Khasiat Penggunaan dan Efek Samping*, Edisi VI, 738-760, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat Dan Makanan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. Hal 747-760.
- Tyler V.E., Brady, L.R., Robbers, J.E (1988) *Pharmacognosy ninth edition* Philadelphia: Lea & Febiger.
- Voigt, R. (1995) *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi edisi V*. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, Indonesia : Halaman 564-577.
- Wadkar, K.A., Magdum, C.S., Patil, S.S., and Naikwade, N.S (2007) Anti-diabetic Potential And Indian Medical Plants. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 2 (1) 45-50.
- Wagner, H., Bladt, S., & Zgainski, E.M. (1984) *Plant Drug Analysis; a Thin Layer Chromatography Atlas*. Berlin: Springer.
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T (2008) *Thin Layer Chromatography In Phytochemistry Volume 99*. Boca Raton: CRC Press
- Waring WS (2007) Antidiabetic drugs. *Elsevier Medicine* 35(11):590-591.

Wu, C (2011) The  $\alpha$ -Glucosidase Inhibiting Isoflavones Isolated from *Belamcanda chinensis* Leaf Extract. *Records of Natural Products* 6(2) : 110-120.

WHO (1999) *Monographs on Selected Medicinal Plants Volume 1..* Geneva: World Health Organization.

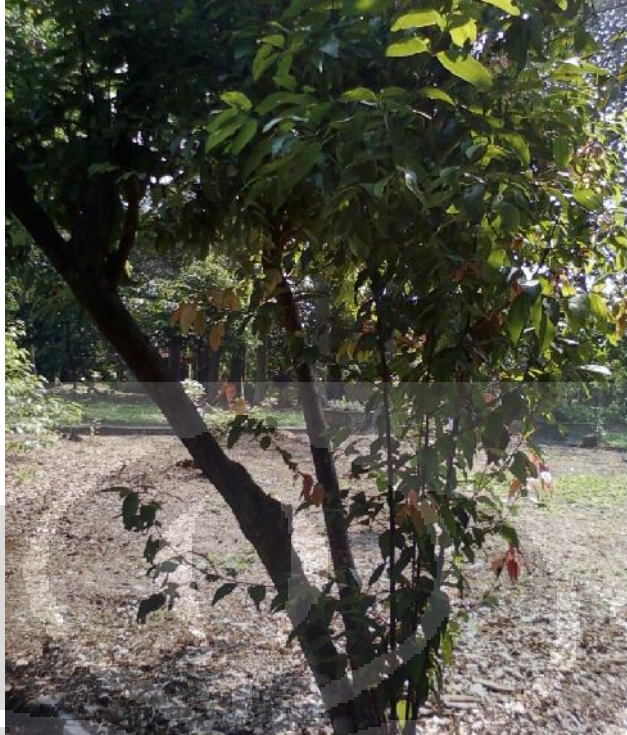
Ziegenfuss, T. N., Jennifer, E., Ronald, W.M., Jamie, L., Richard, A.A (2006) Effects of a Water-Soluble Cinnamon Extract on Body Composition and Features of the Metabolic Syndrome in Pre-Diabetic Men and Women. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 3(2): 45-53





# **GAMBAR**





[Sumber : dokumentasi pribadi]

**Gambar 4.7.** Pohon kayu manis (*Cinnamomum burmannii* Blume)



[Sumber : dokumentasi pribadi]

**Gambar 4.8.** Rajangan kulit batang kayu manis



**Tabel 4.11.** Data nilai aktivitas enzim pada uji optimasi pH

Unit enzim (U/ml)	Konsentrasi Substrat	pH	Serapan		Aktivitas Enzim
			Kontrol Blangko	Blangko	
0,0279	10 mM	6,8	0,061	0,438	0,2316 U/ml 19,300 U/mg
			0,061	0,471	
		7,0	0,060	0,589	0,3035 U/ml 25,292 U/mg
			0,077	0,578	
		7,2	0,057	1,114	0,6365 U/ml 53,042 U/mg
			0,048	1,150	

**Tabel 4.12.** Data nilai aktivitas enzim pada uji optimasi waktu inkubasi

Unit enzim (U/ml)	Konsentrasi Substrat	pH	Waktu inkubasi	Serapan		Aktivitas Enzim
				Kontrol Blangko	Blangko	
0,0279	10 mM	7,0	15	0,060	0,589	0,3035 U/ml 25,292 U/mg
				0,077	0,578	
			20	0,015	0,805	0,3452 U/ml 28,767 U/mg
				0,019	0,792	
			30	0,026	1,346	0,3651 U/ml 30,425U/mg
				0,019	1,177	

**Tabel 4.13.** Data nilai aktivitas enzim pada uji optimasi konsentrasi substrat

Unit Enzim (U/ml)	Konsentrasi Substrat	Serapan		Aktivitas Enzim
		Kontrol Blangko	Blangko	
0,0279	0,625 mM	0,013	0,249	11,492 U/mg
		0,009	0,242	
	1,25 mM	0,029	0,307	14,242 U/mg
		0,020	0,322	
	2,5 mM	0,017	0,448	20,577 U/mg
		0,016	0,422	
	5 mM	0,024	0,519	23,622 U/mg
		0,029	0,496	
	10 mM	0,060	0,589	25,292 U/mg
		0,077	0,578	
	15 mM	0,044	0,685	28,680 U/mg
		0,058	0,585	
	20 mM	0,071	0,645	28,336 U/mg
		0,067	0,647	
	30 mM	0,118	0,632	24,948 U/mg
		0,119	0,620	

**Tabel 4.14.** Aktivitas penghambatan akarbose

Konsentrasi Sampel (ppm)	Serapan							
	Kontrol Blangko	Blangko	Kontrol Sampel	Sampel	Rata-rata Kontrol Sampel	Rata-rata Sampel	Inhibisi (%)	IC50 (µg/mL)
6,28	0,079	0,604	0,083	0,580	0,080	0,582	4,381	235,05
			0,077	0,584				
12,56			0,077	0,545	0,073	0,560	7,238	
			0,069	0,575				
25,12			0,073	0,562	0,075	0,548	9,905	
			0,077	0,534				
50,25			0,085	0,543	0,081	0,535	13,524	
			0,078	0,527				

Persamaan regresi :  $y = 4,166 + 0,195x$

**Tabel 4.15.** Aktivitas penghambatan fraksi ekstrak petroleum eter

Konsentrasi Sampel (ppm)	Serapan						Inhibisi (%)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
	Kontrol Blangko	Blangko	Kontrol Sampel	Sampel	Rata-rata Kontrol Sampel	Rata-rata Sampel		
6,27	0,093	0,676	0,148	0,642	0,147	0,654	13,036	69,717
			0,146	0,667				
12,55			0,147	0,630	0,149	0,634		
			0,151	0,639				
25,10			0,169	0,598	0,157	0,582		
			0,146	0,567				
50,20			0,167	0,535	0,168	0,530		
			0,170	0,525				

$$\text{Persamaan regresi : } y = 10,331 + 0,569x$$

**Tabel 4.16.** Aktivitas penghambatan fraksi ekstrak etil asetat

Konsentrasi Sampel (ppm)	Serapan						Inhibisi (%)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
	Kontrol Blangko	Blangko	Kontrol Sampel	Sampel	Rata-rata Kontrol Sampel	Rata-rata Sampel		
6,28	0,080	0,624	0,097	0,552	0,099	0,543	18,382	19,239
			0,101	0,535				
12,56			0,116	0,403	0,118	0,438		
			0,120	0,473				
25,12			0,132	0,258	0,130	0,254		
			0,128	0,251				
50,25			0,133	0,190	0,132	0,187		
			0,131	0,184				

$$\text{Persamaan regresi : } y = 20,314 + 1,543x$$

**Tabel 4.17.** Aktivitas penghambatan fraksi ekstrak n-butanol

Konsentrasi Sampel (ppm)	Serapan						Inhibisi (%)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
	Kontrol Blangko	Blangko	Kontrol Sampel	Sampel	Rata-rata Kontrol Sampel	Rata-rata Sampel		
6,27	0,088	0,614	0,133	0,444	0,129	0,432	42,395	1,168
			0,125	0,420				
12,55			0,135	0,290	0,130	0,287	70,152	
			0,125	0,284				
25,10			0,133	0,231	0,132	0,259	75,855	
			0,131	0,287				
50,20			0,138	0,195	0,135	0,197	88,213	
			0,132	0,199				

$$\text{Persamaan regresi : } y = 49,000 + 0,856x$$

**Tabel 4.18.** Aktivitas penghambatan fraksi ekstrak air

Konsentrasi Sampel (ppm)	Serapan						Inhibisi (%)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
	Kontrol Blangko	Blangko	Kontrol Sampel	Sampel	Rata-rata kontrol Sampel	Rata-rata Sampel		
6,33	0,076	0,628	0,061	0,519	0,069	0,528	16,848	24,244
			0,077	0,538				
12,66			0,089	0,507	0,086	0,507	23,732	
			0,083	0,508				
25,32			0,087	0,281	0,087	0,274	66,123	
			0,088	0,267				
50,65			0,090	0,151	0,093	0,149	89,855	
			0,096	0,147				

$$\text{Persamaan regresi : } y = 8,639 + 1,706x$$

**Tabel 4.19.** Serapan blanko kinetika inhibisi enzim

Konsentrasi substrat (S) (mM)	Serapan (A)	
	Serapan Blanko	Rata-rata
5	0,463	0,470
	0,477	
10	0,616	0,618
	0,620	
15	0,686	0,680
	0,674	
20	0,656	0,663
	0,670	



**Tabel 4.20.** Serapan sampel kinetika inhibisi enzim

Konsentrasi Substrat (S) (mM)	Serapan Sampel (V)							
	V1		V2		V3		V4	
	Serapan Sampel	Rata-rata	Serapan sampel	Rata-rata	Serapan Sampel	Rata-rata	Serapan Sampel	Rata-rata
5	0,494	0,496	0,326	0,323	0,241	0,234	0,096	0,095
	0,498		0,320		0,227		0,094	
10	0,560	0,558	0,438	0,443	0,320	0,332	0,135	0,132
	0,556		0,449		0,344		0,129	
15	0,588	0,592	0,566	0,568	0,412	0,406	0,157	0,160
	0,596		0,570		0,400		0,163	
20	0,510	0,523	0,457	0,454	0,362	0,376	0,147	0,146
	0,536		0,451		0,390		0,145	

**Tabel 4.21.** Data 1/S dan 1/V kinetika inhibisi enzim

1/S	1/V <sub>0</sub>	1/V <sub>1</sub>	1/V <sub>2</sub>	1/V <sub>3</sub>	1/V <sub>4</sub>
0,2	2,128	2,016	3,096	4,273	10,526
0,1	1,618	1,792	2,257	3,012	7,576
0,07	1,471	1,689	1,761	2,463	6,250
0,05	1,508	1,912	2,203	2,659	6,849

Keterangan : V<sub>0</sub> = blangko (tanpa inhibitor), V<sub>1</sub> = konsentrasi sampel 6,27 ppm, V<sub>2</sub> = konsentrasi sampel 12,55 ppm, V<sub>3</sub> = konsentrasi sampel 25,10 ppm, V<sub>4</sub> = konsentrasi sampel 50,20 ppm

**Tabel 4.22.** Hasil identifikasi golongan terpen dari fraksi ekstrak petroleum eter, etil asetat, n-butanol dan air

No.	Fraksi	Pengamatan warna pada reaksi Liebermann Burchard	Kesimpulan
1.	Petroleum eter	Ungu kebiruan	+
2.	Etil asetat	Coklat	-
3.	n-Butanol	Coklat	-
4.	Air	Coklat	-

**Tabel 4.23.** Hasil identifikasi golongan alkaloid dari fraksi ekstrak petroleum eter, etil asetat, n-butanol dan air

No.	Fraksi	Bouchardat	Mayer	Dragendorf	Kesimpulan
1.	Petroleum eter	-	-	-	-
2.	Etil asetat	-	-	-	-
3.	n-Butanol	-	-	-	-
4.	Air	-	-	-	-

**Tabel 4.24.** Hasil identifikasi golongan saponin dari fraksi ekstrak petroleum eter, etil asetat, n-butanol dan air

No.	Fraksi	Pengamatan Buih	Setelah Penambahan HCl 2N	Kesimpulan
1.	Petroleum eter	-	-	-
2.	Etil asetat	0,2 cm	Buih hilang	-
3.	n- Butanol	2,3 cm	Buih tidak hilang	+
4.	Air	1,5 cm	Buih tidak hilang	+

**Tabel 4.25.** Hasil identifikasi golongan flavonoid dari fraksi ekstrak petroleum eter, etil asetat, n-butanol dan air

No	Fraksi	Dengan Penambahan Mg dan HCl (P)	Dengan Penambahan Zn, HCl 2N dan HCl(P)	Dengan Penambahan Asam Borat dan Asam Oksalat	Kesimpulan
1.	Petroleum eter	-	-	tidak berfluorosensi	-
2.	Etil asetat	Jingga	Merah	fluorosensi kuning	+
3.	n-Butanol	Merah	Merah	fluorosensi kuning	+
4.	Air	Merah	Merah	fluorosensi kuning	+

**Tabel 4.26.** Hasil identifikasi golongan glikosida dari fraksi ekstrak petroleum eter, etil asetat, n-butanol dan air

No.	Fraksi	Molisch	Kesimpulan
1.	Petroleum eter	-	-
2.	Etil asetat	Cincin ungu	+
3.	n-Butanol	Cincin ungu	+
4.	Air	Cincin ungu	+

**Tabel 4.27.** Hasil identifikasi golongan antrakuinon dari fraksi ekstrak petroleum eter, etil asetat, n-butanol dan air

No.	Fraksi	Filtrat	Lapisan air - Lapisan Benzen	Kesimpulan
1.	Petroleum eter	jernih	Jernih-Jernih	-
2.	Etil asetat	jernih	Jernih-kuning	-
3.	n-Butanol	jernih	Jernih-kuning	-
4.	Air	jernih	Jernih-kuning	-

**Tabel 4.28.** Hasil identifikasi golongan tanin dari fraksi ekstrak petroleum eter, etil asetat, n-butanol dan air

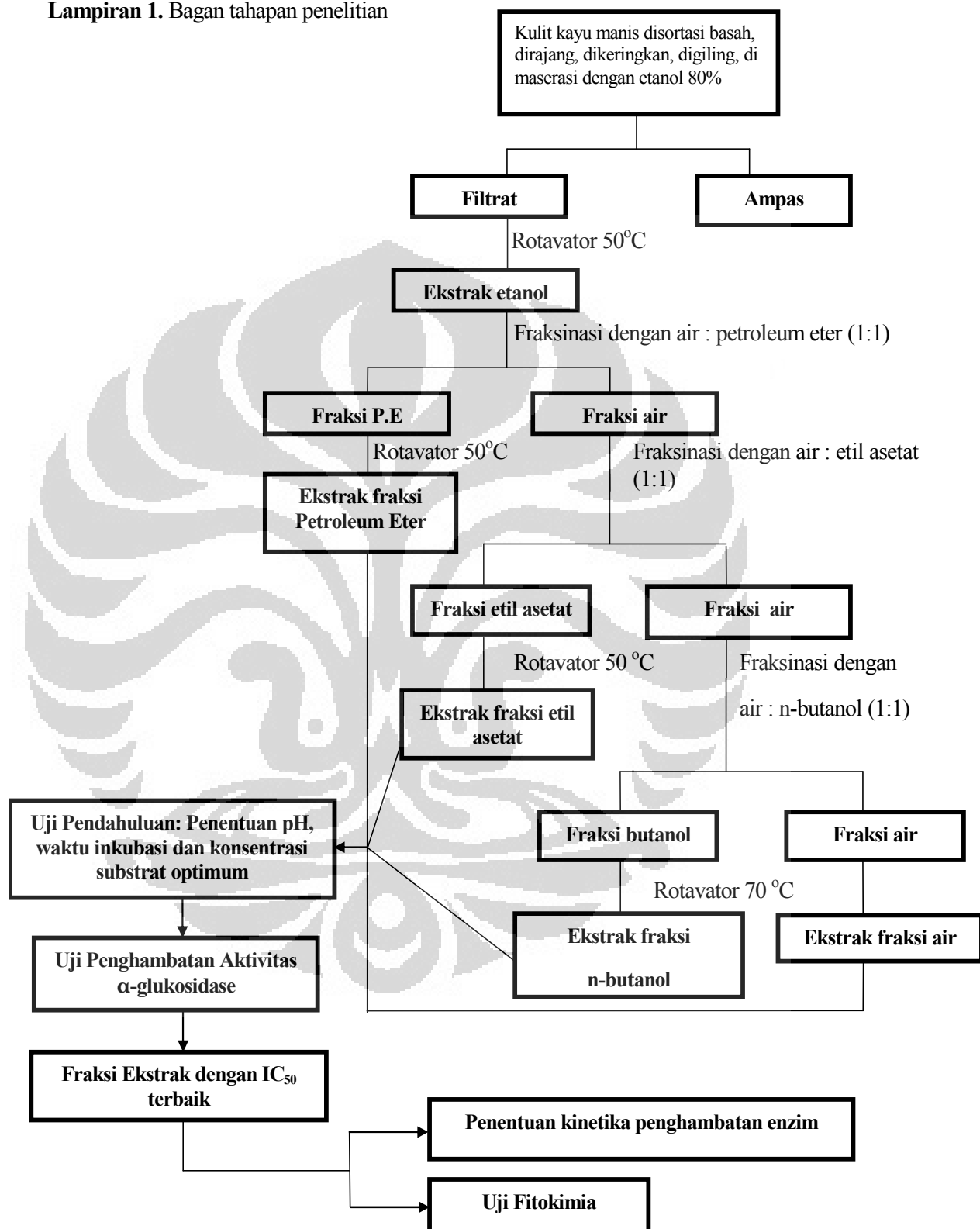
No.	Fraksi	Dengan Penambahan FeCl <sub>3</sub> 3%	Dengan Penambahan NaCl-Gelatin	Dengan Penambahan Gelatin 10%	Kesimpulan
1.	Petroleum eter	-	-	-	-
2.	Etil asetat	Hiaju kebiruan	-	-	-
3.	n-Butanol	Hijau kebiruan	Endapan	Endapan	+
4.	Air	Hijau kebiruan	Endapan	Endapan	+

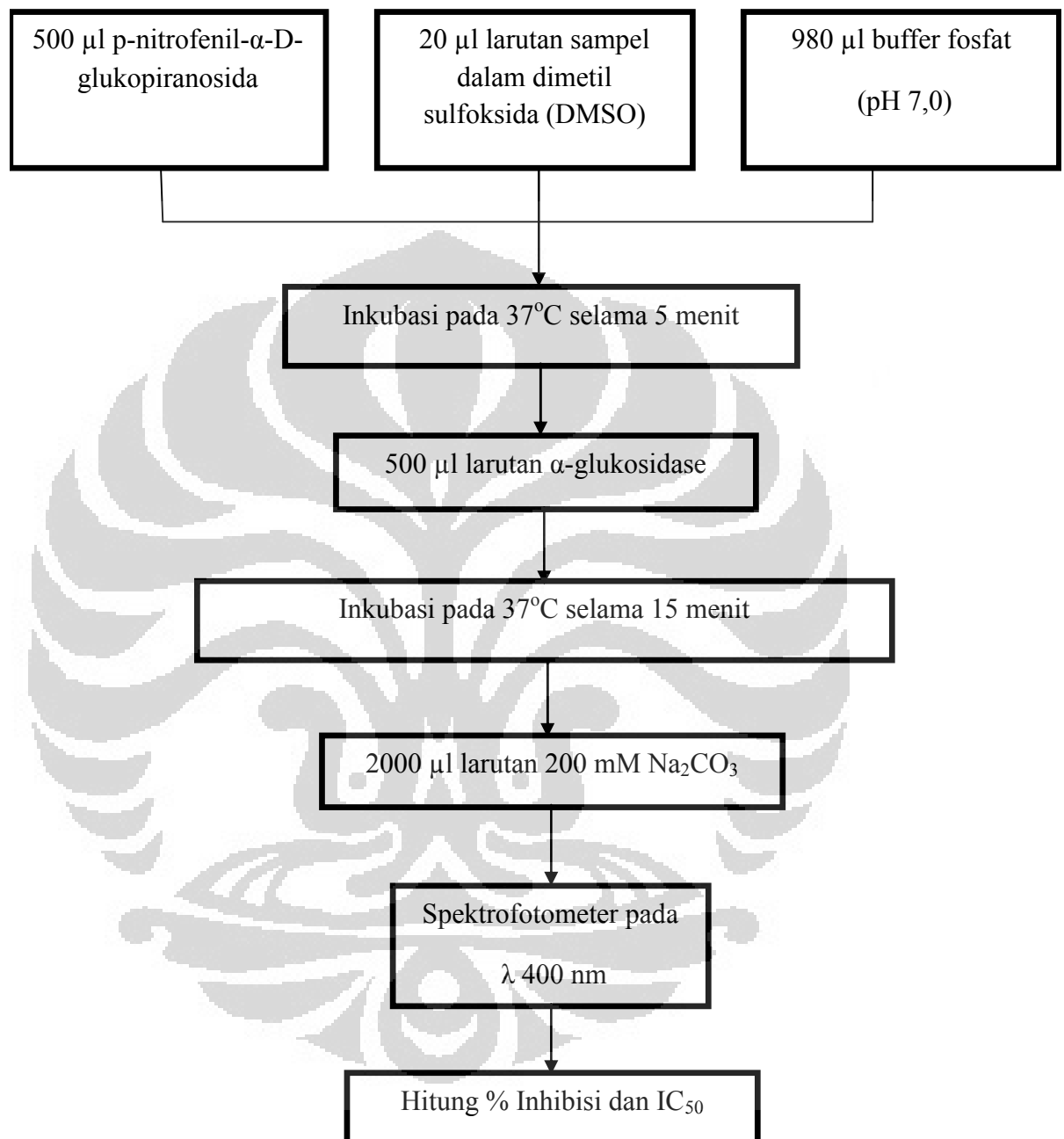


# LAMPIRAN

## LAMPIRAN

Lampiran 1. Bagan tahapan penelitian



**Lampiran 2.** Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase

## Lampiran 3. Surat determinasi



**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**  
 ( Indonesian Institute of Sciences )  
**PUSAT PENELITIAN BIOLOGI**  
 ( Research Center for Biology )

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong  
 Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 22 September 2011

Nomor : 286/IPH.1.02/If.8/IX/2011  
 Lampiran : -  
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.  
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Riza Apriani  
 NPM : 0906601613  
 Mhs. Univ. Indonesia  
 Fak. MIPA  
 Kampus UI Depok, 16424

Dengan hormat,

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

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Kayu Manis	<i>Cinnamomum burmanni</i> (Nees & T.Nees) Blume	Lauraceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani  
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

  
 Dr. Jeeni Setiyo Rahajoe  
 NIP. 196706241993032004



#### Lampiran 4. Perhitungan enzim

Pada label tertulis = 16,5 mg solid ; 26 % protein ; 179 U/mg protein

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

Konsentrasi enzim yang akan dibuat adalah 0,0279 U/ml

$$\text{Pengenceran ke 2} = \frac{0,0279 \text{ U/ml} \times 10 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} = 0,279 \text{ U/ml}$$

$$\text{Pengenceran ke 1} = \frac{0,279 \text{ U/ml} \times 10 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0,558 \text{ U/ml}$$

$$\text{Larutan Induk} = 0,558 \text{ U/ml} \times 100 \text{ ml} = 55,8 \text{ U}$$

$$55,8 \text{ U} : 179 \text{ U/mg protein} = 0,312 \text{ mg protein}$$

$$0,312 \text{ mg protein} \times \frac{16,5 \text{ mg solid}}{4,29 \text{ mg protein}} = 1,2 \text{ mg solid}$$

Sehingga, berat enzim yang ditimbang adalah 1,2 mg

**Lampiran 5.** Perhitungan konsentrasi larutan ekstrak

**a. Pembuatan larutan uji ekstrak petroleum eter dan n-butanol :**

Ditimbang ekstrak Petroleum eter sebanyak 100,4 mg, lalu diencerkan menjadi 4 konsentrasi

$$\text{Larutan sampel} = \frac{0,1004 \text{ g}}{10 \text{ ml}} \times 100 \% = 1,004 \%$$

$$\frac{100,4 \text{ mg}}{10} \times 1.000 = 10.040 \text{ ppm}$$

$$\text{Larutan Uji 1 (1,004\%)} = \frac{0,02 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 10.040 \text{ ppm} = 50,20 \text{ ppm}$$

**Larutan sampel dipipet 5 ml, masukkan dalam 10 ml pelarut**

$$\text{Larutan Uji 2 (0,502\%)} = \frac{0,02 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 5.020 \text{ ppm} = 25,10 \text{ ppm}$$

**Larutan sampel dipipet 5 ml, masukkan dalam 10 ml pelarut**

$$\text{Larutan Uji 3 (0,251\%)} = \frac{0,02 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 2.510 \text{ ppm} = 12,55 \text{ ppm}$$

**Larutan sampel dipipet 5 ml, masukkan dalam 10 ml pelarut**

$$\text{Larutan Uji 4 (0,125\%)} = \frac{0,02 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 1.255 \text{ ppm} = 6,27 \text{ ppm}$$

**b. Pembuatan larutan uji ekstrak etil asetat :**

Ditimbang ekstrak Petroleum eter sebanyak 100,5 mg, lalu diencerkan menjadi 4 konsentrasi

$$\text{Larutan sampel 1} = \frac{0,1005 \text{ g}}{10 \text{ ml}} \times 100 \% = 1,005 \%$$

$$\begin{aligned} & \frac{100,5 \text{ mg}}{10} \times 1.000 = 10.050 \text{ ppm} \\ \text{Larutan Uji 1 (1,005\%)} &= \frac{0,02 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 10.050 \text{ ppm} = 50,25 \text{ ppm} \end{aligned}$$

**Larutan sampel dipipet 5 ml, masukkan dalam 10 ml pelarut**

$$\text{Larutan Uji 2 (0,502\%)} = \frac{0,02 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 5.025 \text{ ppm} = 25,12 \text{ ppm}$$

**Larutan sampel dipipet 5 ml, masukkan dalam 10 ml pelarut**

$$\text{Larutan Uji 3 (0,251\%)} = \frac{0,02 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 2.510 \text{ ppm} = 12,56 \text{ ppm}$$

**Larutan sampel dipipet 5 ml, masukkan dalam 10 ml pelarut**

$$\text{Larutan Uji 4 (0,125\%)} = \frac{0,02 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 1.256 \text{ ppm} = 6,28 \text{ ppm}$$

c. **Pembuatan larutan uji ekstrak air :**

Ditimbang ekstrak n-butanol sebanyak 101,3 mg, lalu diencerkan menjadi 4 konsentrasi

$$\text{Larutan sampel 1} = \frac{0,1013 \text{ g}}{10 \text{ ml}} \times 100 \% = 1,013 \%$$

$$\frac{101,3 \text{ mg}}{10} \times 1.000 = 10.130 \text{ ppm}$$

$$\text{Larutan Uji 1 (1,013\%)} = \frac{0,02 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 10.130 \text{ ppm} = 50,65 \text{ ppm}$$

**Larutan sampel dipipet 5 ml, masukkan dalam 10 ml pelarut**

$$\text{Larutan Uji 2 (0,506\%)} = \frac{0,02 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 5065 \text{ ppm} = 25,32 \text{ ppm}$$

**Larutan sampel dipipet 5 ml, masukkan dalam 10 ml pelarut**

$$\text{Larutan Uji 3 (0,253\%)} = \frac{0,02 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 2.532 \text{ ppm} = 12,66 \text{ ppm}$$

**Larutan sampel dipipet 5 ml, masukkan dalam 10 ml pelarut**

$$\text{Larutan Uji 4 (0,126\%)} = \frac{0,02 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 1.266 \text{ ppm} = 6,33 \text{ ppm}$$

### Lampiran 6. Data perhitungan Rf

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh zat}}{\text{Jarak yang ditempuh pengembang}}$$

1. Identifikasi KLT senyawa terpen pada ekstrak petroleum eter dengan eluen benzene : kloroform (3:7)

No noda	Rf tiap noda pada lampu UV 254 nm	Rf tiap noda setelah disemprot vanilin-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1	$\frac{1,2}{5,5} = 0,22$	$\frac{1,2}{5,5} = 0,22$
2	$\frac{2,9}{5,5} = 0,53$	$\frac{2,2}{5,5} = 0,40$
3	$\frac{4,8}{5,5} = 0,87$	$\frac{3,4}{5,5} = 0,64$
4		$\frac{4,8}{5,5} = 0,87$

2. Identifikasi KLT senyawa flavonoid pada ekstrak etil asetat, n-butanol, dan air

- a. Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak etil asetat dengan heksan - etil asetat (7 : 3)

No noda	Rf tiap noda pada lampu UV 366 nm	Rf tiap noda setelah disemprot AlCl <sub>3</sub>
1	$\frac{0,5}{5,3} = 0,09$	$\frac{0,5}{5,3} = 0,09$
2	$\frac{3,9}{5,3} = 0,74$	$\frac{3,7}{5,3} = 0,70$

- b. Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak n-butanol dengan eluen n-butanol - asam asetat - air (4 : 1: 5)

No noda	Rf tiap noda pada lampu UV 366 nm	Rf tiap noda setelah disemprot AlCl <sub>3</sub>
1	$\frac{0,8}{5,4} = 0,15$	$\frac{0,6}{5,4} = 0,11$
2	$\frac{1,8}{5,4} = 0,33$	$\frac{1,6}{5,4} = 0,30$
3	$\frac{3,7}{5,4} = 0,68$	$\frac{3,7}{5,4} = 0,68$

- c. Hasil KLT senyawa flavonoid pada ekstrak air dengan eluen n-butanol - asam asetat - air (4 : 1: 5)

No noda	Rf tiap noda pada lampu UV 366 nm	Rf tiap noda setelah disemprot AlCl <sub>3</sub>
1	$\frac{3,7}{5,3} = 0,70$	$\frac{4}{5,3} = 0,75$
2	$\frac{4,7}{5,3} = 0,89$	$\frac{4,7}{5,3} = 0,89$