



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS ALFA-GLUKOSIDASE
DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI
FRAKSI AKTIF EKSTRAK BIJI MAHONI
(*Swietenia macrophylla* King)**

SKRIPSI

**AYUTI HAQQI ALIYAN
0906601336**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS ALFA-GLUKOSIDASE
DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI
FRAKSI AKTIF EKSTRAK BIJI MAHONI
(*Swietenia macrophylla* King)**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi

**AYUTI HAQQI ALIYAN
0906601336**

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

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
Dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
Telah saya nyatakan benar.



Nama : Ayuti Haqqi Aliyan
NPM : 0906601336
Tanda Tangan : 
Tanggal : 25 Januari 2012

HALAMAN PEGESAHAN

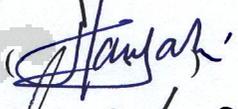
Skripsi ini diajukan oleh :

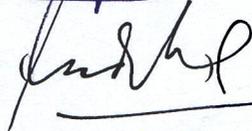
Nama : Ayuti Haqqi Aliyan
NPM : 0906601336
Program Studi : Sarjana Ekstensi Farmasi
Judul Skripsi : Uji Penghambatan Aktivitas Alfa-glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Aktif Ekstrak Biji Mahoni (*Swietenia macrophylla* King)

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

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

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

Penguji I : Dra. Maryati Kurniadi, M.Si., Apt. ()

Penguji II : Prof. Dr. Endang Hanani, M.S., Apt. ()

Penguji III : Prof. Dr. Atiek Soemiati, M.S., Apt. ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 25 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur hanya kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan kasih sayang-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi yang berjudul “Uji Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Aktif Ekstrak Biji Mahoni (*Swietenia Macrophylla* King)” ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari, bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

- 1) Bapak Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt., selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
- 2) Ibu Dr. Katrin, M.S., selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini Kepala Laboratorium Fitokimia Departemen Farmasi FMIPA UI;
- 3) Ibu Prof.Dr. Yahdiana Harahap, M.S., Apt., selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
- 4) Ibu Dr. Azizahwati, M.S., Apt., selaku ketua Program Studi Ekstensi Departemen Farmasi FMIPA UI;
- 5) Ibu Nadia Farhanah Syafhan, S.Farm., M.Si., selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;
- 6) Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;

- 7) Para laboran serta karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu terlaksananya penelitian ini;
- 8) Pihak Kebun Raya Bogor dan LIPI yang telah membantu dalam pengadaan bahan baku tanaman serta determinasi tanaman.
- 9) Bapak, ibu, Adik dan Kakak yang senantiasa memberikan doa, kasih sayang, dukungan material dan moril demi kelancaran studi penulis;
- 10) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis berharap Tuhan yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangannya, baik dari segi ilmiah maupun penyajiannya. Penulis berharap penelitian ini dapat bermanfaat bagi rekan-rekan Farmasi khususnya dan para pengembang ilmu pengetahuan, sehingga manfaatnya dapat dirasakan oleh masyarakat.

Penulis

2012

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

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

Nama : Ayuti Haqqi Aliyan
NPM : 0906601336
Program Studi : Sarjana Ekstensi Farmasi
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 Alfa-Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Aktif Ekstrak Biji Mahoni (*Swietenia macrophylla* King)

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 mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 25 Januari 2012

Yang menyatakan



(Ayuti Haqqi Aliyan)

ABSTRAK

Nama : Ayuti Haqqi Aliyan
Program Studi : Farmasi
Judul : Uji Penghambatan Aktivitas Alfa-glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Aktif Ekstrak Biji Mahoni (*Swietenia macrophylla* King)

Diabetes mellitus (DM) ditandai dengan tingginya kadar gula darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid dan protein sebagai akibat insufisiensi fungsi insulin. Dalam upaya mencari pengobatan alternatif dengan resiko yang sedikit untuk diabetes, beberapa ekstrak tanaman telah diuji aktivitas antidiabetesnya, salah satunya adalah biji Mahoni yang sudah digunakan oleh masyarakat Indonesia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui penghambatan aktivitas alfa-glukosidase dan mengidentifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi aktif ekstrak biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King). Penghambatan aktivitas alfa-glukosidase diukur menggunakan Spektrofotometer. Hasil menunjukkan bahwa fraksi yang memiliki penghambatan aktivitas alfa-glukosidase paling baik dengan nilai IC_{50} 15,44 ppm adalah fraksi petroleum eter. Uji kinetika fraksi petroleum eter memiliki penghambatan kompetitif dan kandungan senyawa kimia yang terdapat didalam fraksi petroleum eter adalah senyawa terpen.

Kata kunci : *Swietenia macrophylla* King, diabetes melitus, alfa-glukosidase

xiv + 70 halaman : 16 gambar; 16 tabel; 4 lampiran

Daftar referensi : 53 (1965-2011)

ABSTRACT

Name : Ayuti Haqqi Aliyan
Program Study : Pharmacy
Title : Alpha-glucosidase Inhibitory Activity Test and Identification of Chemical Compounds in Active Fraction of Mahogany Seed (*Swietenia macrophylla* King) Extract

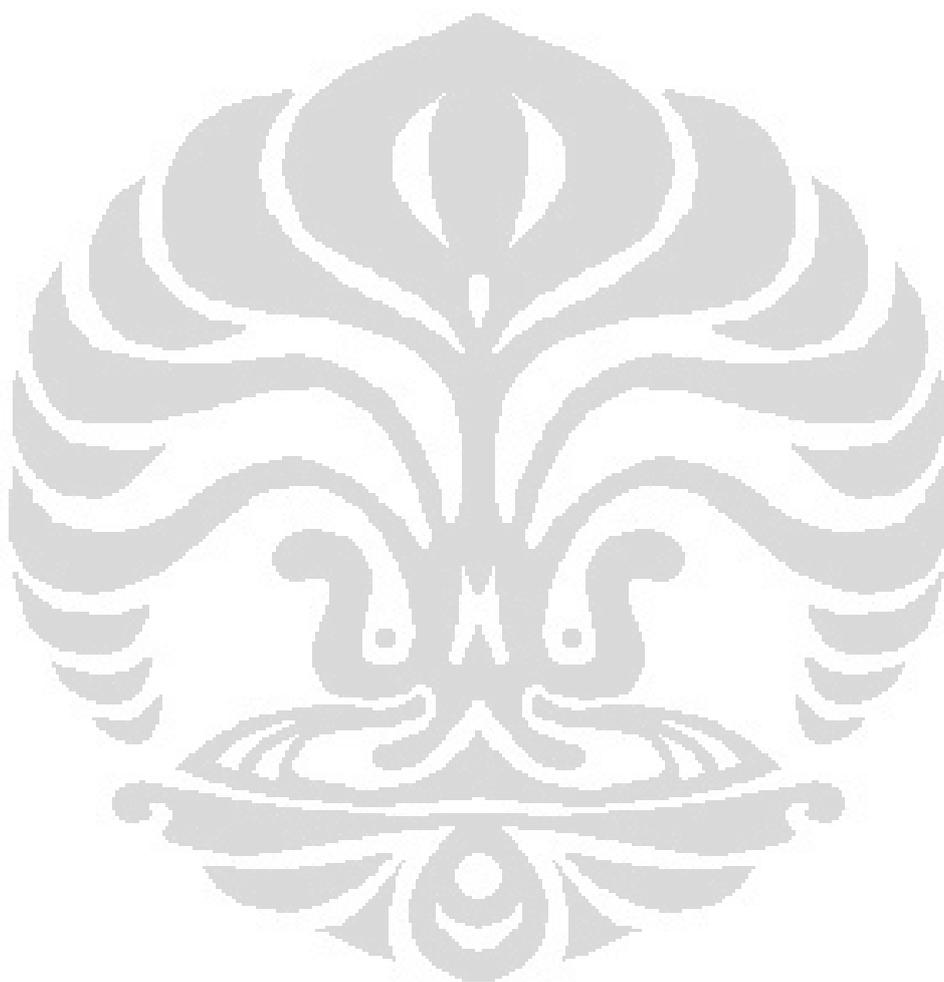
Diabetes mellitus (DM) is characterized by high blood sugar levels along with impaired metabolism of carbohydrates, lipids and proteins as a result of insufficiency of insulin function. In an effort to seek alternative treatment with little risk for diabetes, several plant extracts have been tested antidiabetic activity, one of which is Mahogany seeds that have been used by the people of Indonesia. The purpose of this study was to determine the inhibitory activity of alpha-glucosidase and identify classes of chemical compounds from active fractions of mahogany seed (*Swietenia macrophylla* King) extract. The inhibition of alpha-glucosidase activity is measure using Spectrophotometry, The result showed that fraction has the best inhibitory activity alpha-glucosidase with IC₅₀ values of 15,44 ppm is petroleum ether fraction. Kinetics tested of petroleum ether fraction has a competitive inhibition and chemical compounds that consist in petroleum ether fraction is terpene.

Key words : *Swietenia macrophylla* King, diabetes melitus, alfa-glukosidase
xiv + 70 pages : 16 figures; 16 tables; 4 appendices
Bibliography : 53 (1965-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Diabetes Melitus	4
2.2. Deskripsi Tanaman	7
2.3. Khasiat dan Kandungan Kimia	7
2.4. Fraksinasi	8
2.5. Ekstraksi	8
2.6. Enzim	9
2.7. Agen Penghambat Alfa-glukosidase	11
2.8. Uji Penghambatan Alfa-glukosidase	12
2.9. Kinetika Enzim	13
2.10. Penapisan Fitokimia	16
BAB 3. METODE PENELITIAN	19
3.1. Waktu dan Tempat	19
3.2. Bahan	19
3.3. Alat	20
3.4. Tahapan Kerja	20
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1. Penyiapan Bahan	34
4.2. Ekstraksi Simplisia	34
4.3. Aktivitas Enzim	35
4.4. Optimasi Enzim	36
4.5. Uji Penghambatan Aktivitas Enzim	38
4.6. Uji Kinetika Penghambatan Ezim	40
4.7. Identifikasi Kandungan Kimia	42

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	46
5.1. Kesimpulan	46
5.2. Saran	46
DAFTAR ACUAN	47



DAFTAR GAMBAR

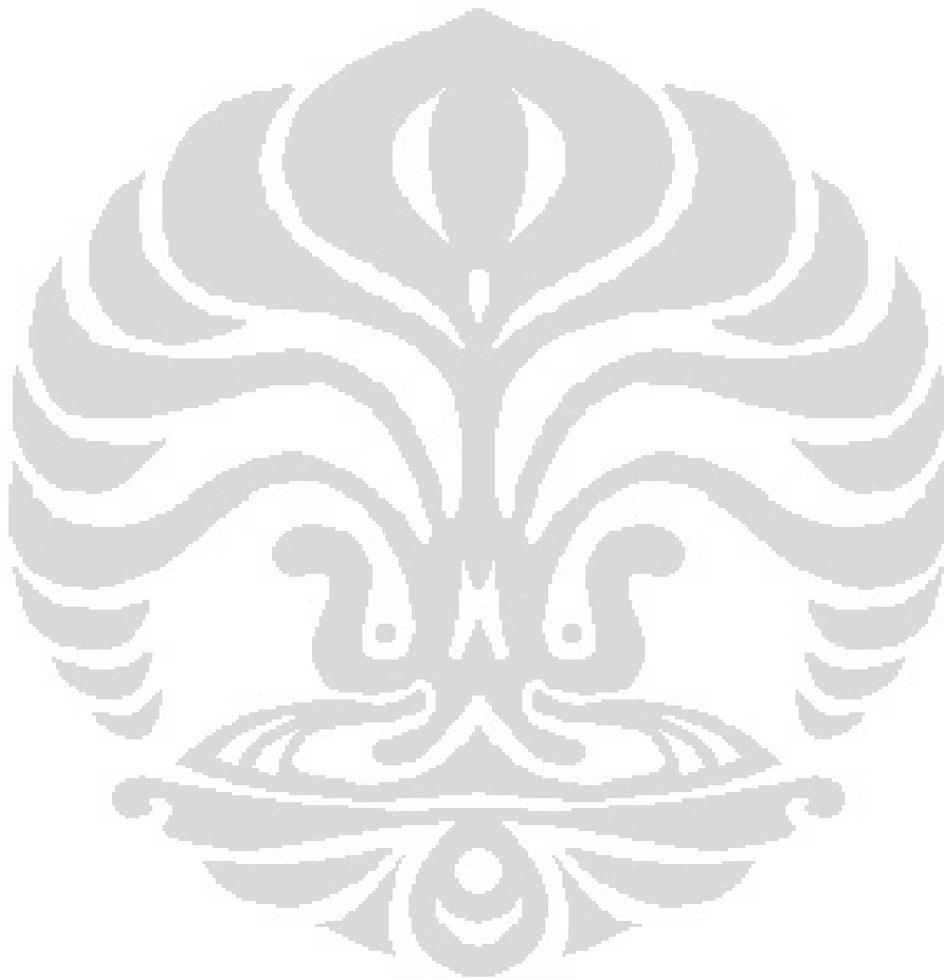
Gambar 2.1.	Rumus Bangun Akarbose.....	12
Gambar 2.2.	Persamaan Reaksi Enzimatik Alfa-glukosidase dan <i>p</i> -nitrofenil - α -D-glukopiranosida	14
Gambar 2.3.	Plot Lineweaver-Burk Pada Inhibisi Kompetitif.....	15
Gambar 2.4.	Plot Lineweaver-Burk Pada Inhibisi Nonkompetitif	16
Gambar 4.1.	Grafik Optimasi Aktivitas Enzim Dengan Variasi Konsentrasi Substrat	38
Gambar 4.2.	Plot Lineweaver-Burk Hasil Uji Kinetika Pada Fraksi Petroleum Eter	41
Gambar 4.3.	Hasil KLT Fraksi Petroleum Eter Dengan Eluen Benzene : Etil Asetat (8:2) Dengan Penampak Noda Vanilin-H ₂ SO ₄	43
Gambar 4.4.	Hasil KLT Fraksi Petroleum Eter Dengan Eluen Benzene : Etil Asetat (8:2) Asetat Dengan Penampak Noda Liebermann- Burchard	44
Gambar 4.5.	Biji Mahoni (<i>Swietenia macrophylla</i> King).....	52
Gambar 4.6.	Biji Mahoni (<i>Swietenia macrophylla</i> King) Tanpa Kulit Biji.....	52
Gambar 4.7.	Ekstrak Biji Mahoni dari Fraksi Petroleum Eter.....	53
Gambar 4.8.	Ekstrak Biji Mahoni dari Fraksi Etil Asetat	53
Gambar 4.9.	Ekstrak Biji Mahoni dari Fraksi Butanol	53
Gambar 4.10.	Ekstrak Biji Mahoni dari Fraksi Air.....	53
Gambar 4.11.	Penapisan Glikosida Menggunakan Pereaksi Mollish.....	54
Gambar 4.12.	Penapisan Terpen Menggunakan Pereaksi Liebermann-Burchard	54

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Prosedur Uji Pendahuluan	24
Tabel 3.2.	Sistem Reaksi Uji Penghambatan Alfa-glukosidase.....	29
Tabel 4.1.	Hasil KLT Senyawa Terpen Pada Fraksi Petroleum Eter dengan Eluen Benzene : Etil Asetat (8:2) dan Penampak Noda Vanilin-H ₂ SO ₄	43
Tabel 4.2.	Hasil KLT Senyawa Terpen Pada Fraksi Petroleum Eter dengan Eluen Benzene : Etil Asetat (8:2) dan Penampak Noda Liebermann-Burchard.....	44
Tabel 4.3.	Rendemen Tanaman Uji	55
Tabel 4.4.	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Konsentrasi Substrat 10 mM, pH 7,0, Suhu 37 ⁰ C, dan Waktu Inkubasi 15 menit.....	55
Tabel 4.5.	Optimasi pH dengan Konsentrasi Substrat 10 mM, Suhu 37 ⁰ C, dan Waktu Inkubasi 15 menit.....	56
Tabel 4.6.	Optimasi Waktu Inkubasi dengan Konsentrasi Substrat 10 mM, dan pH 7,0, dan Suhu 37 ⁰ C	57
Tabel 4.7.	Optimasi Substrat dengan pH 7,0 dan Waktu Inkubasi 15 menit, dan Suhu 37 ⁰ C	58
Tabel 4.8.	Aktivitas Penghambatan Alfa-glukosidase Pada Akarbose.....	59
Tabel 4.9.	Aktivitas Penghambatan Alfa-glukosidase dari Fraksi Petroleum Eter	60
Tabel 4.10.	Aktivitas Penghambatan Alfa-glukosidase dari Fraksi Etil Asetat.....	61
Tabel 4.11.	Aktivitas Penghambatan Alfa-glukosidase dari Fraksi Butanol	62
Tabel 4.12.	Aktivitas Penghambatan Alfa-glukosidase dari Fraksi Air	63
Tabel 4.13.	Kinetika Penghambatan Alfa-glukosidase Oleh Fraksi Petroleum Eter ...	64
Tabel 4.14.	Hasil Identifikasi Kandungan Kimia Tiap Fraksi	65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Bagan Tahapan Kerja.....	66
Lampiran 2.	Cara Perhitungan Unit Larutan Alfa-glukosidase.....	68
Lampiran 3.	Hasil Identifikasi Tanaman.....	69
Lampiran 4.	Sertifikat Analisis Alfa-glukosidase.....	70



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut WHO (*World Health Organization*) diabetes mellitus (DM) didefinisikan sebagai suatu penyakit atau gangguan metabolisme kronis dengan multi etiologi yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid dan protein sebagai akibat insufisiensi fungsi insulin. Insufisiensi fungsi insulin dapat disebabkan oleh gangguan atau defisiensi produksi insulin oleh sel-sel beta Langerhans kelenjar pankreas, atau disebabkan oleh kurang responsifnya sel-sel tubuh terhadap insulin (Depkes, 2005).

Kebiasaan makan yang tidak sehat dan kurang olah raga, menyebabkan jumlah penderita diabetes meningkat, dari diperkirakan 30 juta penderita pada tahun 1985 dan 130 juta pada tahun 1995 akan menjadi 330 juta pada tahun 2025 (IDF, 2003), 90% pasien diabetes adalah diabetes mellitus tipe 2. Penderita diabetes tipe 2 yang berhasil menurunkan berat badan dan menjaga pola diet, tetapi masih gagal dalam mengontrol gula darah akan dianjurkan oleh dokter untuk menggunakan obat antidiabetes oral (Dipiro, Talbert, & Yee, 1997)

Beberapa obat konvensional yang digunakan dalam menurunkan kadar gula darah memiliki beberapa efek samping seperti hipoglikemia dan penambahan berat badan. Namun, Agen Penghambat alfa-glukosidase (akarbose, voglibose, dan miglitol) tidak menimbulkan efek samping seperti hipoglikemia dan penambahan berat badan (Wells, Dipiro, Schwinghammer, & Hamilton, 2003), namun menimbulkan rasa tidak enak di perut seperti flatulen, diare, dan sakit perut (Van der Laar FA, et al, 2005).

Agen Penghambat alfa-glukosidase (akarbose, voglibose, dan miglitol) dapat menunda pemecahan karbohidrat di usus dan menurunkan absorpsi gula (Van de Laar FA *et al*, 2011). Penghambatan aktivitas alfa-glukosidase di intestinal adalah strategi yang penting untuk mengontrol

hiperglikemia postprandial pada diabetes (Ali, Chatterjee, & Debasis, 2011) yang menyebabkan komplikasi makrovaskular (Gin & Rigalleau, 2000).

Dalam upaya mencari pengobatan alternatif dengan resiko yang sedikit untuk diabetes, beberapa ekstrak tanaman telah diuji aktivitas antidiabetesnya. Tanaman yang telah terbukti sebagai agen penghambat alfa-glukosidase antara lain daun jambu biji (Wang, Yang-Ji, & Hua-Can, 2010), kulit kayu mangga (Prasanth, Amit, dan Samiulla, 2001), & Meniran (Kumar, Smita, & Vipin, 2010).

Mahoni tersebar di Indonesia, Filipina, dan Malaysia sebagai upaya reboisasi hutan dan diperdagangkan, seperti jenis *Swietenia mahagoni* (L.) Jack. dan *Swietenia macrophylla* King. *Swietenia mahagoni* (L.) Jack. lebih mudah terkena hama dan penyakit dan pertumbuhannya lebih lama dari *Swietenia macrophylla* King (Soerianegara & Lemmens, 1994). Di Indonesia biji mahoni juga digunakan sebagai antidiabetik.

Penelitian tentang biji mahoni telah dilakukan pada jenis *Swietenia mahagoni* (L.) Jack., ekstrak etanolnya memiliki nilai IC_{50} sebesar 7,30 ppm (Mashita, 2011). Selain itu, penelitian biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King) menggunakan ekstrak metanol secara *in vivo* telah dilakukan dengan menggunakan tikus albino wistar menunjukkan hasil yang signifikan terhadap penurunan glukosa darah (Maiti, Dewanjee, & Jana, 2008). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk membuktikan mekanisme penghambatan fraksi aktif dari ekstrak etanol biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King) dengan menggunakan etanol 80%, kemudian dilakukan fraksinasi yang dilakukan secara bertingkat dan pelarut yang digunakan mulai dari pelarut non polar ke pelarut polar, yaitu mulai dari petroleum eter, etil asetat, butanol dan air.

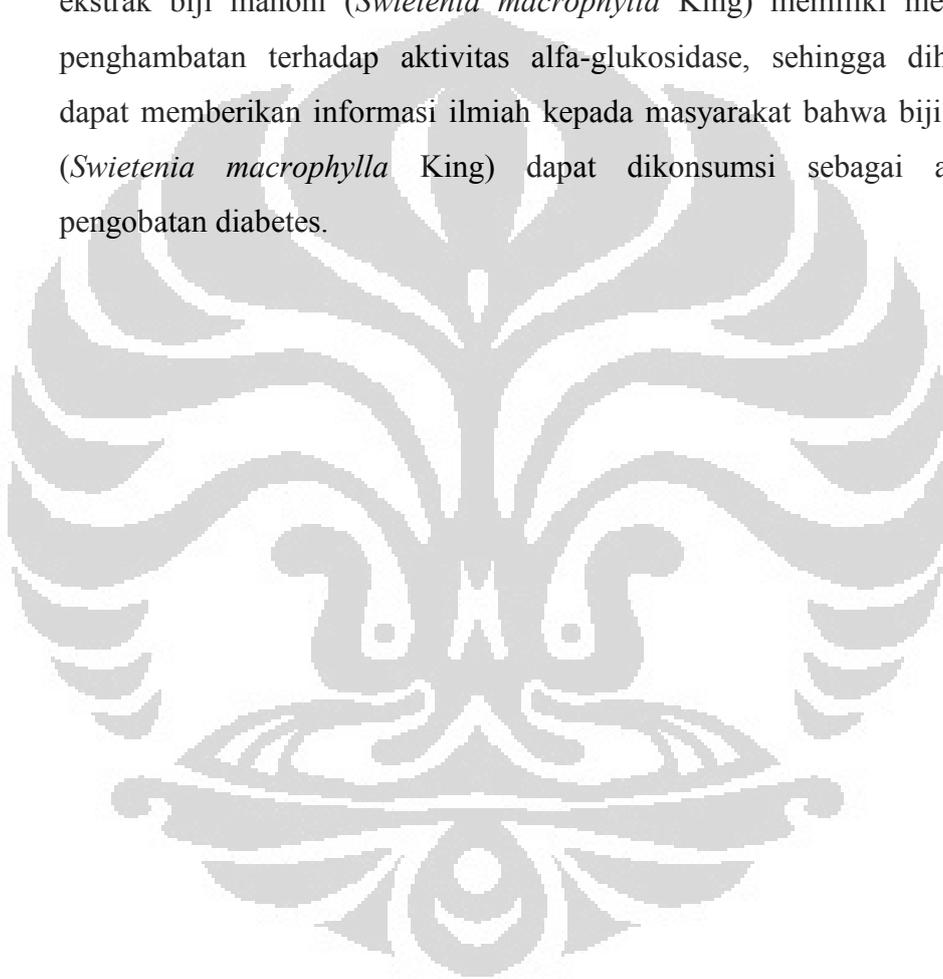
Uji penghambatan aktivitas alfa-glukosidase dilakukan dengan metode *Spectrofotometric Stop Rate Determination* (Sigma Aldrich, 1996). Hasil penghambatan reaksi enzimatik diukur menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm dan nilai penghambatan ditetapkan dengan menggunakan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi yang dapat menghambat 50% aktivitas alfa-glukosidase dalam kondisi pengujian.

1.2 TUJUAN PENELITIAN

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui penghambatan aktivitas alfa-glukosidase dan mengidentifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi aktif ekstrak biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King).

1.3 MANFAAT

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa ekstrak biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King) memiliki mekanisme penghambatan terhadap aktivitas alfa-glukosidase, sehingga diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat bahwa biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King) dapat dikonsumsi sebagai alternatif pengobatan diabetes.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus

2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi Diabetes Melitus secara umum diabetes melitus dapat dibedakan menjadi diabetes tipe I, diabetes tipe 2, dan diabetes gestasional. Diabetes tipe I diperkirakan terjadi akibat destruksi autoimun sel-sel beta pulau Langerhans. Individu yang memiliki kecenderungan genetik penyakit ini tampaknya menerima faktor pemicu dari lingkungan yang menginisiasi proses autoimun. Faktor pencetus yang mungkin antara lain infeksi virus misalnya gondongan (*mumps*), rubela, sitomegalovirus kronik, atau setelah pajanan obat atau toksin tertentu juga diduga dapat memicu serangan autoimun ini (Corwin, 2008).

Diabetes tipe 2 adalah penyakit hiperglikemia akibat insensitivitas sel terhadap insulin. Selain itu, terjadi defek sekresi insulin karena ketidakmampuan pankreas untuk menghasilkan insulin yang cukup untuk mempertahankan glukosa plasma yang normal. Meskipun kadar insulin mungkin sedikit menurun atau berada dalam rentang normal, jumlah insulin tetap rendah, sehingga kadar glukosa plasma meningkat. Diabetes Mellitus tipe II tampaknya berkaitan dengan kegemukan. Selain itu, pengaruh genetik, yang menentukan kemungkinan seseorang mengidap penyakit ini cukup kuat (Corwin, 2008).

Diabetes gestasional adalah diabetes yang terjadi pada wanita hamil yang sebelumnya tidak mengidap diabetes. Meskipun diabetes tipe ini sering membaik setelah persalinan, sekitar 50% wanita pengidap kelainan ini tidak akan kembali ke status nondiabetes setelah kehamilan berakhir. Bahkan, jika membaik setelah persalinan, resiko untuk mengalami diabetes tipe II setelah sekitar 5 tahun pada waktu mendatang lebih besar daripada normal (Corwin, 2008).

2.1.2 Gejala Diabetes dan Pengobatan

Penyakit diabetes mellitus dapat menunjukkan gejala klinis yang bermacam-macam. Beberapa gejala yang dapat terlihat dari pasien penderita diabetes mellitus adalah poliuria (peningkatan pengeluaran urin), polidipsia (peningkatan rasa haus), polifagia (peningkatan rasa lapar), rasa lelah dan kelemahan otot akibat katabolisme protein di otot dan ketidakmampuan sebagian besar sel untuk menggunakan glukosa sebagai energi (Corwin, 2008).

2.1.2.1 Terapi Nonfarmakologi

a. Diet

Diet yang dianjurkan adalah makanan dengan komposisi yang seimbang dalam hal karbohidrat, protein, dan lemak. Jumlah kalori disesuaikan dengan pertumbuhan, status gizi, umur, dan kegiatan fisik, yang pada dasarnya ditujukan untuk mencapai dan mempertahankan berat badan ideal. Penurunan berat badan dapat mengurangi resistensi insulin dan memperbaiki respon sel-sel beta terhadap stimulus glukosa. Selain itu, asupan serat dapat penting karena dapat menghambat penyerapan lemak (Depkes RI, 2005).

b. Olah raga

Olah raga untuk penderita diabetes pada umumnya ringan dan dilakukan secara teratur. Olah raga dapat meningkatkan aktivitas reseptor insulin dalam tubuh dan meningkatkan penggunaan glukosa (Depkes RI, 2005).

2.1.2.2 Terapi Farmakologi

Terapi obat diperlukan apabila terapi tanpa obat seperti pengaturan diet dan olah raga belum berhasil mengendalikan kadar glukosa darah. Terapi obat yang diberikan baik dalam bentuk antidiabetes oral ataupun terapi insulin (Depkes RI, 2005). Antidiabetes oral meliputi agen yang meningkatkan sekresi insulin seperti Sulfonilurea, biguanid, tiazolidin dan

agen penghambat alfa-glukosidase (Katzung, 2008), dan penghambat Dipeptidil Peptidase IV (ACP, 2007).

a. Sulfonilurea

Sulfonilurea bekerja meningkatkan sekresi insulin dari pankreas (ACP, 2007). Efek samping yang sering terjadi adalah hipoglikemia dan penambahan berat badan (Wells, Dipiro, & Schwinghammer, 2003),

b. Meglitinid

Meglitinid merupakan antidiabetik oral dengan mekanisme kerja meningkatkan sekresi insulin secara cepat seperti golongan sulfonilurea, sehingga disebut agen sekresi insulin nonsulfonilurea (ACP, 2007), tetapi pengeluaran insulin bergantung dari konsentrasi gula darah, sehingga dapat mengurangi terjadinya hipoglikemia berat (Wells, Dipiro, & Schwinghammer, 2003)

c. Biguanid

Biguanid menghambat glukoneogenesis hati dan meningkatkan glikogenolisis yang rendah (ACP, 2007). efek samping yang umum adalah mual, muntah, diare, anoreksia, dan rasa logam di mulut (Wells, Dipiro, & Schwinghammer, 2003)

d. Tiazolidin

Tiazolidin meningkatkan sensitivitas insulin dalam otot dan lemak (ACP, 2007). efek sampingnya adalah edema, peningkatan berat badan (Wells, Dipiro, Schwinghammer, & Hamilton, 2003),

e. Penghambat alfa-glukosidase

Penghambat alfa-glukosidase yang menghambat secara kompetitif enzim alfa-glukosidase di usus kecil, sehingga penyerapan karbohidrat tertunda (ACP, 2007). Efek sampingnya adalah diare, (Wells, Dipiro, & Schwinghammer, 2003)

f. Penghambat Dipeptidil Peptidase IV

Obat ini menghambat dipeptidil peptidase IV yaitu enzim yang menurunkan sekresi inkretin. Hormon inkretin dapat meningkatkan sekresi insulin dan menekan sekresi glukagon (ACP, 2007).

2.2 DESKRIPSI TANAMAN

2.2.1 Klasifikasi Tanaman

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Sapindales
Suku	: Meliaceae
Marga	: Swietenia Jacq.
Jenis	: <i>Swietenia macrophylla</i> King (USDA, 2011)

2.2.2 Morfologi

Pohon dengan tinggi 40 (-60) m, percabangan sedikit, panjangnya yaitu 18 (-25) m dengan diameter hingga 150 (-200) cm, kulit kayu tua bersisik kasar dan memiliki kerutan longitudinal dan berwarna coklat keabu-abuan, hingga coklat kemerahan, kulit kayu bagian dalam berwarna merah kecoklatan atau kemerahan. Daun (2-) 3-6 (-8) pasang dengan ukuran (8-) 9-13 (-18) cm x 3-4 (-5,5) cm; ukuran bunga 10-18 (-20) cm. Buah mengeras seperti kayu berbentuk kapsul, Ukuran kapsul 10-15 (-22) cm, panjang biji 7,5-12 cm ketika membuka biasanya membentuk 5 sudut yang memanjang, 5 tempat sayap tersebut terlihat setelah biji terlepas. Biji bersayap, datar, tertutup, menggantung, dan berhimpit (Soerianegara & Lemmens, 1994).

2.3 Khasiat dan Kandungan Kimia

Biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King) memiliki kandungan senyawa kimia seperti tetranotriterpenoid (Swietenin, Swietenolid) (Solomon *et. al.*, 2003; Connoly *et. al.*, 1965), Limonoid (Swieteolid diasetat, augustineolide) (Chan *et. al.*, 1976; Mootoo *et.al.*, 1999). Ekstrak petroleum eter biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King) dapat berkhasiat sebagai antidiare (Maiti, Saikat, dan Subhash, 2007) dan fraksi etil asetat dari ekstrak etanol dapat melawan karsinoma pada manusia (Goh & Habsah, 2011).

2.4 Simplisia

Menurut Materia Medika Indonesia, simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun, dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan alam yang dikeringkan. Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah berupa simplisia nabati, yaitu simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman tertentu, atau eksudat tanaman. Eksudat tanaman ialah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau isi sel yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya dan belum berupa zat kimia murni (Depkes RI, 2000).

2.5 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut, sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain. Metode ekstraksi menggunakan pelarut terdiri dari cara dingin dan cara panas (Depkes RI, 2000).

2.5.1 Cara Dingin

Ekstraksi cara dingin dapat dilakukan dengan maserasi atau perkolasi. Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (suhu kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya.

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) yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

2.5.2 Cara Panas

Ekstraksi cara panas dilakukan dengan refluks, soxhlet, digesti, infus, dan dekok. 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.

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

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50⁰C.

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98⁰C) selama waktu tertentu (15-20 menit). Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (>30⁰C) dan temperatur sampai titik didih air.

2.6 Enzim

Enzim adalah katalis protein yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia tanpa ikut bereaksi. Enzim memiliki bagian yang disebut *active site*, yang jika berikatan dengan substrat akan membentuk kompleks enzim-substrat. Reaksi dengan enzim sebagai katalis meningkatkan efisiensi, kerjanya dari 10³ menjadi 10⁸ kali lebih cepat daripada tanpa reaksi katalis dengan enzim. Enzim sangat spesifik, berinteraksi dengan satu atau sedikit substrat dan mengkatalis satu tipe reaksi kimia (Champe, Harvey, & Ferrier, 2005).

Enzim hampir semuanya spesifik untuk satu substrat. Penambahan substrat dan pengamatan terhadap ada atau tidaknya produk memastikan adanya enzim (McPherson & Pincus, 2007).

Kejenuhan enzim terjadi ketika kecepatan tidak memperlihatkan adanya reaksi dengan peningkatan substrat. Biasanya reaksi kimia terjadi dengan kecepatan yang sebanding dengan seluruh rentang konsentrasi komponen reaksi. Pada reaksi katalis-enzim, pada konsentrasi substrat yang rendah, kecepatan sebanding dengan konsentrasi substrat. Pada konsentrasi lebih tinggi, kecepatan tidak sebanding dengan peningkatan konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat yang semakin tinggi, kecepatan menjadi konstan dan tidak ada respon perubahan terhadap peningkatan konsentrasi substrat. Katalis enzim memiliki dua tahap proses, pada awal adsorpsi dimana substrat bergabung dengan enzim membentuk kompleks enzim-substrat nonkovalen (ES), diikuti dengan tahap kedua dimana kompleks enzim-substrat terurai menjadi produk (P) dan enzim bebas (E) (McPherson & Pincus, 2007).

Faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi yaitu konsentrasi substrat, temperatur, dan pH.

a. Konsentrasi substrat

Kecepatan maksimal dari reaksi (V) adalah jumlah molekul substrat yang diubah menjadi produk per unit waktu. Kecepatan biasanya dinyatakan sebagai μmol produk yang dibentuk per menit. Kecepatan reaksi katalis-enzim meningkat dengan konsentrasi substrat hingga kecepatan maksimal (V_{max}) dicapai. Kecepatan reaksi berhenti dengan tingginya konsentrasi substrat yang jenuh dari semua sisi dapat yang berikatan pada enzim (Champe, Harvey, & Ferrier, 2005).

Bentuk kurva hiperbola dari kinetika enzim. Enzim menunjukkan kinetika Michaelis-Menten, dimana plot dari kecepatan reaksi (V_0) berlawanan dengan konsentrasi substrat $[S]$ adalah hiperbola (Champe, Harvey, & Ferrier, 2005).

b. Suhu

Peningkatan suhu akan meningkatkan energi kinetik molekul. Peningkatan energi kinetik molekul juga meningkatkan gerakan molekul, sehingga frekuensi tumbukan juga meningkat. Namun,

energi panas juga dapat meningkatkan energi knetik enzim, sehingga enzim mengalami denaturasi (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

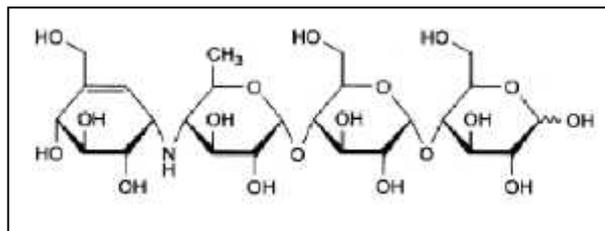
c. pH

Enzim memiliki pH optimum untuk aktivitas maksimum. Biasanya pH dari kondisi reaksi dipilih dimana enzim menunjukkan kecepatan aktivitas tertinggi (McPherson & Pincus, 2007).

2.7 Agen Penghambat Alfa-glukosidase

Agen penghambat alfa-glukosidase memecah sukrosa dan karbohidrat kompleks di usus kecil, sehingga memperpanjang absorpsi karbohidrat efeknya adalah mengurangi konsentrasi gula postprandial, sementara itu tingkat glukosa puasa relatif tidak berubah. Memiliki kontrol gula darah yang sedang dengan rata-rata penurunan HbA_{1C} 0,3-1%. Terapi dimulai dengan dosis yang rendah (25-50 mg dikonsumsi bersama makanan) dan ditingkatkan sampai dosis maksimum 50 mg 3 kali sehari pada pasien dengan berat badan kurang dari 60 kg dan 100 mg tiga kali sehari pada pasien dengan berat badan lebih dari 100 kg. Alfa-glukosidase dapat digunakan pada pasien dengan resiko hipoglikemia pada pasien yang mengalami hiperglikemia postprandial (Wells, Dipiro, Schwinghammer, & Hamilton, 2003).

Alfa-glukosidase yang paling banyak digunakan adalah Akarbose (Cheng Y.Y et al, 2004). Akarbose memiliki nama kimia O-{4-Amino-4,6-dideoxy-N-[1S,4R,5S,6S)-4, 5, 6 – trihydroxy – 3 – hydroxymethylcyclohex – 2 – enyl] – α D-glucopyranosyl } - (1 \rightarrow 4) – O – α D – glucopyranosyl - (1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose. Akarbose merupakan serbuk berwarna putih atau kekuningan dengan rumus empirik C₂₅H₄₃NO₁₈ dan berat molekulnya 645,6 (Martindale, 2007).



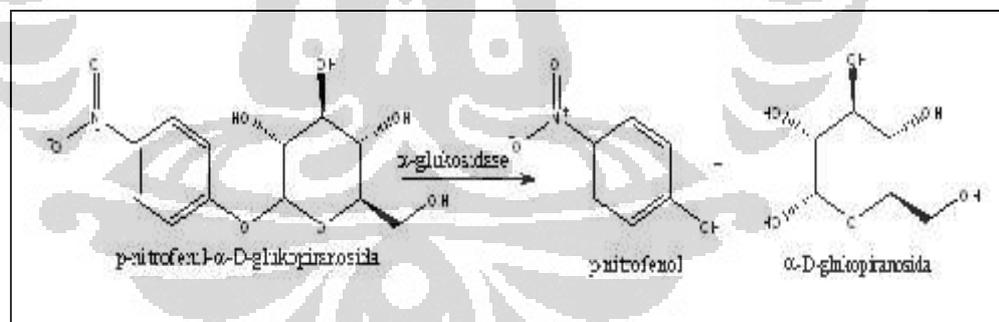
[Sumber : British Pharmacopoeia, 2009]

Gambar 2.1 Rumus bangun Akarbose

Efek samping yang paling umum terjadi adalah flatulen, diare, dan kram perut, yang dapat dikurangi dengan dosis pemberian yang ditingkatkan perlahan (Wells, Dipiro, dan Schwinghammer, 2003).

2.8 Uji Penghambatan Alfa-glukosidase

Uji penghambatan alfa-glukosidase dilakukan untuk mengetahui aktivitas antihiperlikemia dari semua fraksi. Alfa-glukosidase akan menghidrolisis substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida menjadi p-nitrofenol (berwarna kuning) dan glukosa (Cihan, Ozcan, Tekin, & Cokmus, 2010) dengan reaksi sebagai berikut :



[Sumber: Cihan, Ozcan, Tekin, dan Cokmus, 2010]

Gambar 2.2 Persamaan reaksi enzimatik alfa-glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida

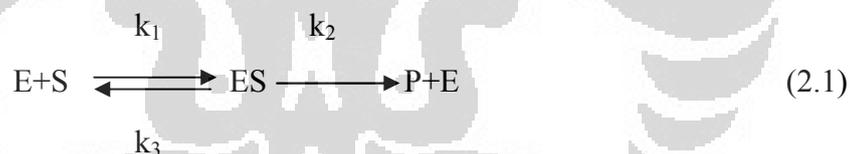
Aktivitas enzim diukur berdasarkan pada absorbansi p-nitrofenil yang berwarna kuning pada λ 400 nm (Kikkoman, 2011).

2.9 Kinetika Enzim

Kinetika enzim merupakan suatu cara utama untuk mengidentifikasi potensi agen terapi yang secara selektif dapat meningkatkan atau menghambat proses katalisis enzim spesifik (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

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

Michaelis dan Menten mengemukakan model sederhana dari reaksi katalis-enzim. Model ini, enzim dengan *reversible* dikombinasikan dengan substrat menjadi bentuk ES kompleks, setelah itu memecahnya menjadi produk dan enzim bebas (Champe, Harvey, & Ferrier, 2005).



Keterangan : S = substrat; E = enzim; ES = kompleks enzim-substrat; P = produk; k_1 , k_2 , k_3 = kecepatan konstan

Persamaan Michaelis-Menten menggambarkan bagaimana variasi kecepatan reaksi dengan konsentrasi substrat :

$$V_1 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.2)$$

Keterangan : V_1 = kecepatan reaksi awal; V_{\max} = kecepatan maksimal; K_m = konstanta Michaelis = $(k_1+k_2)/k_3$; $[S]$ = konsentrasi Substrat

Beberapa kesimpulan dari kinetika Michaelis-Menten yaitu K_m menunjukkan afinitas enzim dengan substrat. K_m sebanding dengan konsentrasi substrat dimana kecepatan reaksi sebanding dengan $\frac{1}{2} V_{max}$. K_m tidak berubah dengan perubahan konsentrasi enzim. Hubungan antara kecepatan dan konsentrasi enzim yaitu kecepatan reaksi berbanding lurus dengan konsentrasi enzim pada semua konsentrasi substrat. Orde reaksi yaitu saat $[S]$ lebih sedikit dari K_m , kecepatan reaksi mendekati konsentrasi substrat yang proporsional. Maka kecepatan reaksi merupakan orde satu. Saat $[S]$ lebih besar dari K_m , kecepatannya konstan sebanding dengan V_{max} . Kecepatan reaksi tidak bergantung pada konsentrasi substrat, dan ini disebut orde nol (Champe, Harvey, & Ferrier, 2005)..

Semua kondisi diatas digambarkan dengan hubungan hiperbolik dari kurva V_1 dan $[S]$. Inversi persamaan Michaelis-Menten menggunakan persamaan Lineweaver-Burk yang memberikan hubungan diantara variabel baru, $1/V_1$ dan $1/[S]$ (McPherson & Pincus, 2007). Plot $1/V_1$ sebagai y dan $1/[S]$ sebagai x menghasilkan garis lurus yang memotong $1/V_{max}$ dengan kecuraman K_m/V_{max} . Plot ini disebut plot Lineweaver-Burk. Plot Lineweaver-Burk ganda membedakan antara inhibitor kompetitif dan nonkompetitif (Murray, Granner, & Rodwel, 2009)

$$\frac{1}{V_1} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.3)$$

Keterangan: V_1 = kecepatan reaksi awal; V_{max} = kecepatan reaksi maksimum; $[S]$ = konsentrasi substrat; K_m = tetapan *Michaelis-Menten*

Substrat yang dapat mengurangi kecepatan katalis enzim disebut inhibitor (Champe, Harvey, & Ferrier, 2005). Penghambatan enzim dapat terjadi *reversible* atau *irreversible*. Pada penghambatan *irreversible*, terbentuk ikatan kovalen diantara inhibitor dan enzim. Aktivitas enzim tidak dapat diperbaiki dengan memisahkan dari inhibitor (McPherson & Pincus, 2007). Penghambat reversible memiliki dua tipe, yaitu kompetitif dan nonkompetitif (Murray, Granner, & Mayes, 2003)

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

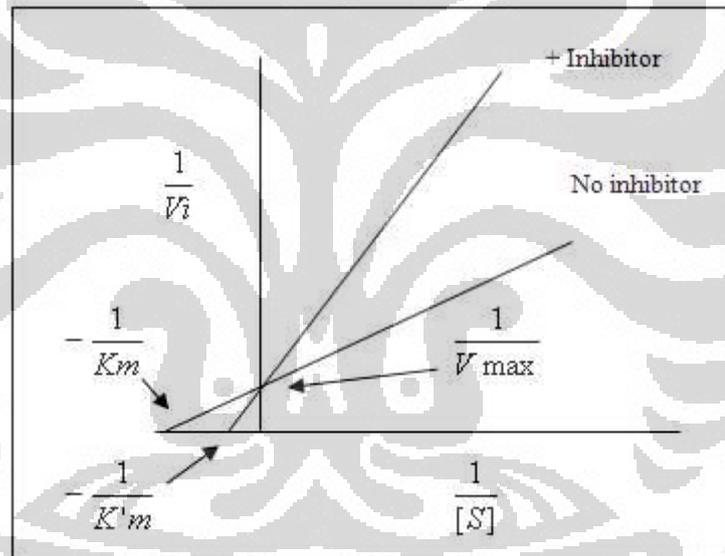
$$y = 0 \rightarrow x = -1/K_m$$

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

$$K_m = b/a \quad (2.4)$$

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

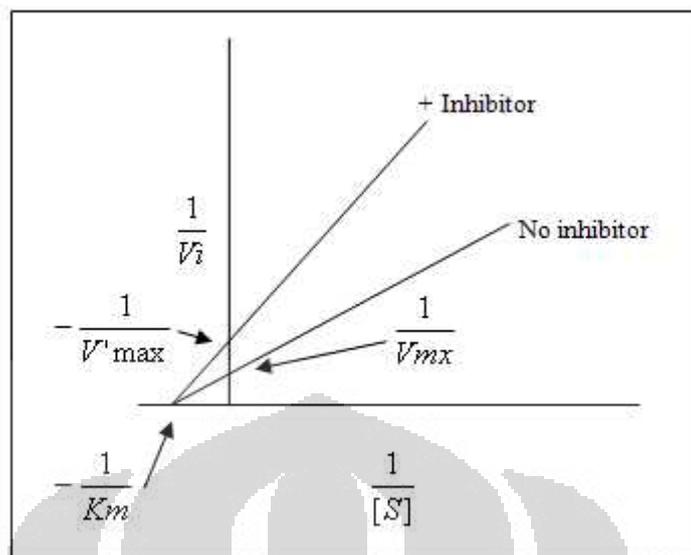
$$V_{\max} = 1/a \quad (2.5)$$



[Sumber: Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003]

Gambar 2.3 Plot Lineweaver-Burk pada inhibisi kompetitif

Penghambat kompetitif terjadi saat inhibitor berikatan dengan substrat pada *active site* yang sama. Hal ini terjadi karena substrat dan inhibitor memiliki struktur yang sama (McPherson & Pincus, 2007). Penghambat kompetitif tidak mengubah V_{\max} karena ikatan inhibitor *reversible* dan dapat diatasi dengan konsentrasi substrat yang tinggi. Tetapi, ikatan substrat-enzim lemah dan afinitas ikatannya terlihat menurun. Oleh karena itu, inhibitor kompetitif meningkatkan K_m (Meisenberg & William, 2006).



[Sumber: Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003]

Gambar 2.4 Plot Lineweaver-Burk pada inhibisi nonkompetitif

Penghambat nonkompetitif terjadi saat ikatan inhibitor pada tempat yang berbeda dari tempat substrat berikatan (McPherson & Pincus, 2007). Inhibitor nonkompetitif tidak mencegah substrat berikatan, tetapi memblokir katalisis enzim. Jika inhibitor nonkompetitif berikatan dengan jumlah yang sama dengan enzim bebas dan kompleks enzim-substrat, hal ini akan mereduksi V_{max} tanpa mengubah K_m (Meisenberg & William, 2006).

2.10. Penapisan Fitokimia (Harborne, 1987)

Penapisan kimia adalah pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa dan diarahkan pada senyawa metabolit sekunder yang memiliki khasiat seperti alkaloid, fenol, flavonoid, glikosida, terpenoid, steroid, tanin dan saponin.

2.10.1 Alkaloid

Alkaloid adalah basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan berbentuk siklik (Harborne, 1987). Alkaloid dalam bentuk garam mudah larut dalam air, sedangkan dalam bentuk basanya mudah larut dalam pelarut organik, tetapi sukar larut dalam air (Sirait, 2007).

2.10.2 flavonoid

Flavonoid berupa senyawa yang mudah larut dalam air dan dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap ada dalam lapisan air setelah ekstrak dikocok dengan eter minyak bumi. Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah bila ditambah basa atau ammonia. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonyugasi, sehingga menunjukkan pita serapan yang kuat pada daerah spektrum UV dan spektrum tampak (Harborne, 1987).

2.10.3 Terpen

Terpen adalah senyawa yang tersusun dari isopren $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan C_5 ini. Terpenoid terdiri dari beberapa macam senyawa mulai dari komponen minyak atsiri seperti monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap, diterpen yang sukar menguap dan yang tidak menguap, yaitu triterpen, dan sterol (Harborne, 1987). Terpen umumnya diekstraksi dari jaringan tumbuhan dengan petroleum eter, eter, dan kloroform (Sirait larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan (Harborne, 1987).

2.10.4 Tanin

Tanin mempunyai kemampuan menyambung silang protein. Tanin secara kimia dikelompokkan menjadi dua golongan, yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal (galokatekin) yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Pada tanin terhidrolisis, deteksi pendahuluan dalam daun atau jaringan lain setelah dihidrolisis asam ialah dengan mengidentifikasi ekstrak eter atau etil asetat yang dipekatkan (Harborne, 1987).

2.10.5 Saponin

Saponin dapat diketahui ketika mengekstraksi jaringan tumbuhan atau waktu pemekatann ekstrak tumbuhan. Deteksi sederhana ialah dengan pengocokan yang kuat dengan air, dapat menimbulkan busa (Harborne, 1987).. Identifikasi saponin dapat dilakukan dengan mengocok ekstrak bersama air hangat di dalam tabung reaksi dan akan timbul busa yang dapat bertahan lama, setelah penambahan HCl 2 N busa tidak hilang (Depkes RI, 1995)

2.10.6 Glikosida

Glikosida merupakan suatu senyawa, bila dihidrolisis akan terurai menjadi gula (glikon) dan senyawa lain (glikon atau genin). Glikosida yang gulanya berupa glukosa disebut glukosida. Umumnya mudah terhidrolisis oleh asam mineral yang memerlukan panas atau enzim yang tidak memerlukan panas. Gula pada glikosida umumnya berupa glukosa, fruktosa, laktosa galaktosa dan manosa (Sirait, 2007).

2.10.7 Kuinon

Kuinon adalah senyawa berwarna dan mempunyai kromofor dasar. Kuinon dibagi menjadi empat kelompok : benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon dan kuinon isoprenoid. Tiga kelompok pertama umumnya terhidroksilasi dan bersifat senyawa fenol dan mungkin terdapat *in vivo* dalam bentuk glikosida. Sedangkan kuinon isoprenoid terlibat dalam respirasi sel (ubikuinon) dan fotosintesis (plastokuinon) dan dengan demikian tersebar luas dalam tumbuhan (Harborne, 1987).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1. Waktu Dan Tempat

Laboratorium Penelitian Fitokimia Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA UI) Depok mulai bulan Agustus hingga Desember 2011.

3.2. Bahan

3.2.1 Bahan Uji

Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah Biji Mahoni dari *Swietenia macrophylla* King, diperoleh dari Kebun Raya Bogor dan dideterminasi oleh Pusat Konservasi Tumbuhan-Kebun Raya Bogor, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

3.2.2 Bahan Kimia

Alfa-glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA), *bovine serum albumin* (Merck, Jerman), paranitrofenil α -D-glukopiranosida (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Jepang), Akarbose, kalium iodida, bismuth nitrat, raksa (II) klorida, α -naftol (Merck, Jerman), kalium dihidrogen fosfat (Merck, Jerman), natrium hidoksida (Univar, USA), dimetil sulfoksida (Merck, Jerman), natrium karbonat (Merck, Jerman), asam klorida (Merck, Jerman), natrium sulfat anhidrat (Merck, Jerman), asam nitrat (Merck, Jerman), anhidrida asam asetat (Univar, USA), serbuk seng (Merck, Jerman), serbuk magnesium (Merck, Jerman), serbuk asam borat, serbuk asam oksalat, natrium klorida (Mallinkrodt chemicals, USA), gelatin, besi (III) klorida, asam sulfat (Merck, Jerman), etanol (teknis), petroleum eter (teknis), etil asetat (teknis), butanol (teknis).

3.3 Alat

Alat refluks, Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-265, Jepang), lemari pendingin (Panasonic), penguap vakum putar (Janke & Kunkel IKA, Jerman), oven (Hotpack vacuum oven), alat penggiling (Phillips), timbangan analitik (Acculab), pHmeter (Eutech pH-510), penangas air, termometer, alat-alat gelas, *vortex mixer* (VM-2000), pipet volume, pipet mikro 10-100 μ l dan 100-1000 μ l (Eppendorf dan Socorex), kuvet kuarsa (Merck, Jerman), alat gelas lainnya.

3.4 Tahapan Kerja

Tahapan kerja meliputi : Penyiapan simplisia, ekstraksi, fraksinasi, uji pendahuluan optimasi enzim alfa-glukosidase, uji aktifitas penghambatan alfa-glukosidase, Identifikasi kandungan kimia fraksi yang aktif, kromatografi lapis tipis.

3.4.1 Penyiapan Simplisia

Pertama-tama bagian tanaman yang ingin diteliti dikumpulkan, kulit biji dikupas, lalu biji dikeringkan. Setelah kering, biji digiling dengan blender untuk memperoleh bentuk serbuk.

3.4.2 Ekstraksi

Ekstraksi simplisia sebanyak 20 g menggunakan etanol 80% 200 ml sebagai pelarut, kemudian direfluks pada suhu 60^o-70^oC selama 1 jam. Saring ekstrak yang terbentuk, kemudian ulangi proses ekstraksi yang sama pada ampas. Ekstraksi diulangi sampai minimal 3 kali hingga didapat larutan yang jernih, lalu saring dan diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* (pada suhu 50^oC) hingga menjadi ekstrak kental. Setelah itu ekstrak ditimbang untuk mengetahui rendemen yang dihasilkan.

3.4.3 Fraksinasi

Ekstrak etanol yang diperoleh difraksinasi bertingkat menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda dari pelarut nonpolar sampai polar dengan petroleum eter, fraksi etil asetat, fraksi butanol, dan air.

Ekstrak etanol didispersikan dengan air panas, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, difraksinasi berturut-turut dengan pelarut petroleum eter dengan perbandingan air panas dan petroleum eter sama banyak. Kemudian fraksi petroleum eter dan fraksi air yang didapat dipisahkan. Fraksi airnya difraksinasi dengan etil asetat, lalu dipisahkan antara fraksi etil asetat dan fraksi air. Fraksi airnya difraksinasi dengan butanol, lalu dipisahkan antara fraksi butanol dan fraksi air. Masing-masing fraksi dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*.

3.4.4 Persiapan Larutan Pereaksi

3.4.4.1 Pereaksi Uji Penghambatan Aktivitas Alfa-glukosidase

a. Larutan dapar fosfat pH 7,0

Larutan dapar fosfat pH 7,0 dibuat dari campuran 0,1 M dikalium hidrogen fosfat dan 0,1 M kalium dihidrogen fosfat. Larutan 0,1 m dikalium hidrogen fosfat dibuat dengan cara 17,418 g dikalium hidrogen fosfat dalam aquades hingga 1000 mL, sedangkan 0,1 M kalium dihidrogen fosfat dibuat dengan cara 13,609 g kalium dihidrogen fosfat dalam akudes hingga 1000 mL.

b. Larutan dapar fosfat pH 6,8

Larutan dapar fosfat pH 6,8 dibuat dari campuran 50,0 mL KH_2PO_4 0,1 M dicampurkan dengan 22,4 mL NaOH 0,1 N, kemudian diencerkan dengan aquadest bebas CO_2 hingga 200,0 mL. Kemudian pH larutan diperiksa dengan menggunakan pH meter. Larutan KH_2PO_4 0,1 M dibuat dengan cara 13,609 g KH_2PO_4 dilarutkan dalam 1000,0 mL aquades, sedangkan NaOH 0,1 N dibuat dengan cara 4,0005 g NaOH dilarutkan dalam aquades hingga 1000,0 mL.

c. Larutan natrium karbonat 0,2 M

Sebanyak 21,2 g natrium karbonat ditimbang. Kemudian dilarutkan dalam aquades hingga 1000 mL.

d. Penyiapan larutan pembawa enzim

Larutan pembawa enzim dibuat dengan cara 200 mg *Bovin serum albumin* (BSA) dilarutkan dalam dapar fosfat pH 7,0 hingga 100 ml.

e. Larutan enzim

Larutan enzim dibuat dengan menimbang 1,2 mg alfa-glukosidase dilarutkan dalam pembawa enzim hingga 100 ml dalam kondisi dingin. Kemudian larutan induk enzim diencerkan dengan dapar fosfat pH 7,0 hingga diperoleh larutan enzim 0,028 U/mL.

f. Larutan substrat

Larutan substrat 10 mM dibuat dengan cara menimbang sebanyak 301,25 mg p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida, kemudian dilarutkan dalam aquades ad 100 ml.

3.4.4.2 Pereaksi Identifikasi Kandungan Kimia

a. Larutan pereaksi Mayer

Pereaksi Mayer dibuat dari campuran larutan raksa (II) klorida P 2,266% b/v dan kalium iodida P 50% b/v. 1,3596 g raksa (II) klorida P dilarutkan dalam 60 ml aquades (A) dan 5 g kalium iodida P dilarutkan dalam 10 mL aquades (B). Kedua larutan (A dan B) dicampur dan dicukupkan dengan aquades hingga 100 mL.

b. Larutan pereaksi Dragendorff

Pereaksi Dragendorff dibuat dari campuran bismuth nitrat P 40% b/v dalam asam nitrat dan kalium iodida P 54,4% b/v. Larutan bismuth nitrat dibuat dengan cara 8 g bismuth nitrat P dilarutkan dalam 20 mL asam nitrat dan larutan kalium iodida dibuat dengan cara 27,2 g kalium iodida P dilarutkan dalam 50 mL aquades. Kedua larutan dicampur, dan didiamkan hingga memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan dicukupkan dengan aquades hingga 100 mL.

c. 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 aquades hingga 100 mL.

d. Larutan pereaksi Molish

Pereaksi Mollisch merupakan larutan α -naftol P 3% b/v dalam asam nitrat 0,5N. Pembuatan dilakukan dengan cara 1,5 g α -naftol P dilarutkan dalam 50 ml asam nitrat 0,5N.

3.4.5 Uji Pendahuluan

3.4.5.1 Uji Aktivitas Enzim

Sebanyak 20 μ L dimetil sulfoksida (DMSO), 980 μ L dapar fosfat pH 7,0 dan 500 μ L p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 500 μ L larutan enzim, lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 2 mL Na₂CO₃ 0,2 M sebagai penghenti reaksi. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 400 nm. Dapat dilihat pada Tabel 2.1

3.4.5.2 Uji Kontrol Blanko Aktivitas Enzim

Sebanyak 20 μ L dimetil sulfoksida (DMSO), 980 μ L dapar fosfat pH 7,0 dan 500 μ L p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 2 mL Na₂CO₃ 0,2 M sebagai penghenti reaksi, lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 500 μ L larutan enzim. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 400 nm. Dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 3.1 Prosedur uji pendahuluan

Reagen	Volume (μ l)	
	U	K
DMSO	20	20
Dapar pH 7,0	980	980
Substrat	500	500
Inkubasi 37°C selama 5 menit		
Enzim	500	-
Na ₂ CO ₃	-	2000
Inkubasi 37°C selama 15 menit		
Enzim	-	500
Na ₂ CO ₃	2000	-
Serapan diukur pda $\lambda = 400$ nm		

Keterangan : U = larutan uji; K = kontrol Blanko

3.4.5.3 Perhitungan Aktivitas Enzim (Kikkoman Corporation, 2001)

$$\text{Volume Activity } U/ml = \frac{(A_s - A_o) \times V_{tot} \times df}{1,81 \times V_e \times t} \quad (3.1)$$

$$\text{Weight activity } (U/mg) = (U/ml) \times 1/C \quad (3.2)$$

Keterangan : A_s = Absorbansi larutan sampel; A_o = Absorbansi larutan blanko (penambahan enzim setelah natrium karbonat); V_{tot} = Volume total; df = Faktor pengenceran; 18,1 = Koefisien ekstingsi milimolar p-nitrofenol pada kondisi uji; V_e = Volume larutan enzim; t = Waktu inkubasi enzim (menit); C = banyaknya α -glukosidase dalam larutan uji (mg/ml).

Satu unit alfa-glukosidase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk melepas 1 μ mol D-glukosa dari p-Nitrofenol per menit pada pH 7,0 dan suhu 37°C.

3.4.5.4 Uji Optimasi pH

Dapar fosfat sebanyak 980 μL dengan pH berbeda yaitu : 6,8 dan 7,0 masing-masing diinkubasi dengan 20 μL dimetil sulfoksida (DMSO), 500 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) dengan konsentrasi optimum selama 5 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 500 μL larutan enzim dengan aktivitas optimum, lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 2000 μL Na_2CO_3 0,2 M sebagai penghenti reaksi. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 400 nm. Dapat dilihat pada Tabel 2.2

3.4.5.5 Uji Kontrol Blanko Optimasi pH

Dapar fosfat sebanyak 980 μL dengan pH berbeda yaitu : 6,8 dan 7,0 masing-masing diinkubasi dengan 20 μL dimetil sulfoksida (DMSO), 500 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) dengan konsentrasi optimum selama 5 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 2000 μL Na_2CO_3 0,2 M sebagai penghenti reaksi lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 500 μL larutan enzim dengan aktivitas optimum. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 400 nm. Dapat dilihat pada Tabel 2.2

3.4.5.6 Uji Optimasi Waktu Inkubasi

Sebanyak 20 μL dimetil sulfoksida (DMSO), 980 μL dapar fosfat pH optimum dan 500 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) dengan konsentrasi optimum selama 5 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 500 μL larutan enzim dengan aktivitas optimum, buat triplo lalu masing-masing diinkubasi selama 15, 20, dan 30 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 2000 μL Na_2CO_3 0,2 M sebagai penghenti reaksi. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 400 nm. Dapat dilihat pada Tabel 2.2

3.4.5.7 Uji Kontrol Blanko Optimasi Waktu Inkubasi

Sebanyak 20 μL dimetil sulfoksida (DMSO), 980 μL dapar fosfat pH optimum dan 500 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) dengan konsentrasi optimum selama 5 menit pada suhu 37°C . Ditambahkan 2000 μL Na_2CO_3 0,2 M sebagai penghenti reaksi, buat triple lalu masing-masing diinkubasi selama 15, 20, dan 30 menit pada suhu 37°C . Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 500 μL larutan enzim dengan aktivitas optimum. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 400 nm. Dapat dilihat pada Tabel 2.2

3.4.5.8 Uji Optimasi Konsentrasi Substrat

Sebanyak 20 μL dimetil sulfoksida (DMSO), 980 μL dapar fosfat pH 7,0 dan 500 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) dengan berbagai konsentrasi berbeda diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C . Ditambahkan 500 μL larutan enzim, lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C . Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 2 mL Na_2CO_3 0,2 M sebagai penghenti reaksi. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 400 nm. Dapat dilihat pada Tabel 2.2

3.4.5.9 Uji Optimasi Konsentrasi Substrat (Kontrol Blanko)

Sebanyak 20 μL dimetil sulfoksida (DMSO), 980 μL dapar fosfat pH 7,0 dan 500 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) dengan konsentrasi berbeda diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C . Ditambahkan 2 mL Na_2CO_3 0,2 M sebagai penghenti reaksi, lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C . Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 500 μL larutan enzim. Kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 400 nm. Dapat dilihat pada Tabel 2.2

3.4.6 Uji Aktivitas Penghambatan Alfa-glukosidase (Dewi, R.T., et al., 2007)

3.4.6.1 Penyiapan Larutan Akarbose

Sebanyak 100 mg Akarbose dilarutkan dengan dapar fosfat pH optimum hingga 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan 1%. Larutan 1% Akarbose diencerkan dengan dapar fosfat pH optimum hingga diperoleh konsentrasi larutan 0,5%, demikian seterusnya hingga diperoleh konsentrasi larutan 0,25%, dan 0,125%.

3.4.6.2 Penyiapan Larutan Sampel (Ekstrak)

Sebanyak 100 mg ekstrak yang dilarutkan dengan dimetil sulfoksida (DMSO) kemudian cukupkan volume dengan dapar fosfat pH optimum pada labu ukur 10 mL, sehingga didapatkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 1%. Larutan ekstrak 1% diencerkan dengan dapar fosfat pH optimum hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 0,5%, demikian seterusnya hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 0,25%, dan 0,125%.

3.4.6.3 Pengujian Sampel

Sebanyak 20 μ L larutan ekstrak ditambahkan dengan 960 μ L dapar fosfat pH optimum dan 500 μ L larutan substrat p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) dengan konsentrasi optimum. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 500 μ L larutan enzim dengan konsentrasi optimum, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama waktu inkubasi optimum. Setelah itu, ditambahkan 2000 μ L Na₂CO₃ 200 mM, lalu larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 400 nm. Dapat dilihat pada Tabel 2.2

3.4.6.4 Pengujian Kontrol Sampel

Sebanyak 20 μ L larutan ekstrak ditambahkan dengan 960 μ L dapar fosfat pH optimum dan 500 μ L larutan substrat p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) dengan konsentrasi optimum. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Setelah itu, ditambahkan 2000

$\mu\text{L Na}_2\text{CO}_3$ 200 mM, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama selama waktu inkubasi optimum, setelah itu ditambahkan 500 μL larutan enzim dengan konsentrasi optimum. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 400 nm. Dapat dilihat pada Tabel 2.2

3.4.6.5 Pengujian Akarbose

Sebanyak 50 μL larutan Akarbose ditambahkan dengan 960 μL dapar fosfat pH optimum dan 500 μL larutan substrat p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) dengan konsentrasi optimum. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C . Ditambahkan 500 μL larutan enzim dengan konsentrasi optimum, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama selama waktu inkubasi optimum. Setelah itu, ditambahkan 2000 $\mu\text{L Na}_2\text{CO}_3$ 200 mM, kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 400 nm. Dapat dilihat pada Tabel 2.2.

3.4.6.6 Pengujian Kontrol Akarbose

Sebanyak 20 μL larutan Akarbose ditambahkan dengan 960 μL dapar fosfat pH optimum dan 500 μL larutan substrat p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) dengan konsentrasi optimum. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C . Setelah itu, ditambahkan 2000 $\mu\text{L Na}_2\text{CO}_3$ 200 mM, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama selama waktu inkubasi optimum. Setelah itu ditambahkan 500 μL larutan enzim dengan konsentrasi optimum kemudian larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 400 nm. Dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 3.2 Sistem reaksi uji penghambatan alfa-glukosidase

Reagen	Volume (µl)					
	Bo	B1	So	S1	Ao	A1
Sampel	-	-	20	20	20	20
DMSO	20	20	-	-	-	-
Dapar	980	980	980	980	980	9860
PNP-G	500	500	500	500	500	500
Inkubasi (37°C)	5 menit					
Enzim	-	500	-	500	-	500
Natrium Karbonat	2000	-	2000	-	2000	-
Inkubasi (37°C)	15 menit					
Enzim	500	-	500	-	500	-
Natrium Karbonat	-	2000	-	2000	-	2000

Keterangan: Bo = Kontrol blangko; B₁ = Blangko; So = Kontrol sampel;
S₁ = Sampel; Ao = Kontrol Acarbose; A₁ = Acarbose

Masing-masing pengujian dilakukan sebanyak 2 kali. Penghambatan aktivitas alfa-glukosidase dapat ditentukan dari % penghambatan dan IC₅₀.

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

Keterangan: S = absorbansi sampel (selisih absorbansi blangko dengan absorbansi kontrol blangko (S₁-S₀)); C = absorbansi kontrol (DMSO) (selisih absorbansi sampel dengan absorbansi kontrol sampel (B₁-B₀))

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

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

3.4.7 Uji Kinetika Penghambatan Enzim

Penentuan kinetika penghambatan enzim dilakukan dengan variasi konsentrasi p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida sebagai substrat serta menggunakan ekstrak pada empat konsentrasi berbeda dan satu larutan blanko. Jenis penghambatan ditentukan dengan analisis data menggunakan plot *Lineweaver-Burke* untuk mendapatkan tetapan kinetika *Michaelis-Menten* (Dewi *et al*, 2007). Tetapan kinetika *Michaelis-Menten* dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = a + bx$, di mana $1/S$ sebagai sumbu x merupakan jumlah substrat dan $1/V$ sebagai sumbu y. Jenis inhibisi dapat juga dilihat dari bentuk plot *Lineweaver-Burk* (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

3.4.8 Identifikasi Kandungan Kimia

3.4.8.1 Identifikasi Alkaloid (Depkes RI, 1995)

Sejumlah 50 mg ekstrak dilarutkan dengan 9 ml air suling dan 1 ml HCL 2 N, kemudian dipanaskan 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 1 ml filtrat dipindahkan pada kaca arloji, ditambah 2 tetes Bouchardat LP. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan coklat hitam.
- b. Sejumlah 1 ml filtrat dipindahkan pada kaca arloji, ditambah 2 tetes Mayer LP. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau kuning yang larut dalam methanol P.
- c. Sejumlah 1 ml filtrat dipindahkan pada kaca arloji, ditambah 2 tetes Dragendorff LP. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga coklat.

3.4.8.2 Identifikasi Glikosida (Depkes RI, 1995)

Sejumlah 50 mg ekstrak kental ditambahkan 25 ml air dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4 M, kocok, diamkan selama 5 menit dan saring. Sari filtrat tiga kali, tiap kali dengan 20 ml campuran (3:1) kloroform P dan

isopropanol. Pada kumpulan sari tambahkan natrium sulfat anhidrat, saring, dan uapkan pada suhu tidak lebih dari 50°. Larutkan sisa dengan 2 ml methanol. Larutan ini digunakan sebagai larutan percobaan.

- a. Uapkan larutan percobaan sebanyak 1 mL hingga kering, sisanya ditambahkan 5 ml asam asetat anhidrat P dan 10 tetes asam sulfat P. Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna biru atau hijau.
- b. Larutan percobaan sebanyak 1 mL diuapkan hingga kering, sisanya dilarutkan dengan 2 mL air dan 5 tetes Molisch LP. Kemudian ditambahkan 2 mL asam sulfat P dengan hati-hati. Hasil positif ditandai oleh terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan (Reaksi Molisch).

3.4.8.3 Identifikasi Saponin (Depkes RI, 1995)

Sejumlah 50 mg ekstrak dimasukan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air suling panas, dinginkan, kocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N , buih tidak hilang.

3.4.8.4 Identifikasi Flavonoid (Depkes RI, 1995)

- a. Sejumlah 50 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 ml etanol 95% kemudian 2 ml larutan ekstrak diambil, ditambahkan 0,5 gram serbuk seng, kemudian ditambahkan 2 ml HCl 2N, diamkan 1 menit. Setelah itu ditambahkan 10 tetes HCl pekat. Kocok perlahan, kemudian diamkan 2-5 menit. Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna merah intensif.
- b. Sejumlah 50 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 ml etanol 95% kemudian 2 ml larutan ekstrak diambil, ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat. Kocok perlahan. Terbentuk warna merah jingga hingga merah ungu yang menunjukkan positif adanya flavonoid. Jika terjadi warna kuning jingga, menunjukkan adanya flavon, kalkon, dan auron.

- c. Sejumlah 50 mg ekstrak dilarutkan dengan aseton. Kemudian ditambahkan sedikit serbuk asam borat dan asam oksalat, dipanaskan hati-hati. Ditambahkan 10 ml eter. Amati dengan sinar ultraviolet 366 nm. Larutan akan berfluoresensi kuning intensif yang menunjukkan positif flavonoid.

3.4.8.5 Identifikasi Tanin (Farnsworth, 1966)

Sejumlah 50 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 mL air suling panas dan diaduk. Setelah dingin disentrifugasi dan bagian cairan didekantisir dan diberi larutan NaCl 10% kemudian disaring. Filtrat sebanyak masing-masing 1 mL dikerjakan sebagai berikut :

- a. Ditambahkan 3 mL larutan gelatin 10% dan diperhatikan adanya endapan.
- b. Ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 3% dan diperhatikan terjadinya perubahan warna menjadi hijau violet.
- c. Ditambahkan 3 mL larutan NaCl-gelatin (larutan gelatin 1% dalam larutan NaCl 10%) dan diperhatikan adanya endapan.

3.4.8.6 Identifikasi Kuinon (Depkes RI, 1995)

Sejumlah 50 mg ekstrak dilarutkan dengan 5 mL asam sulfat 2 N, panaskan sebentar kemudian dinginkan. ditambahkan 10 mL benzene P, kocok, diamkan. Pisahkan lapisan benzene, saring, filtrat berwarna kuning menunjukkan adanya antrakuinon. Kocok lapisan benzene dengan 1-2 mL natrium hidroksida 2 N, diamkan, lapisan air berwarna merah intensif dan lapisan benzen tidak berwarna.

3.4.8.7 Identifikasi Terpen (Farnsworth, 1966)

Sejumlah 50 mg ekstrak ditambahkan eter kemudian asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (2:1). Hasil positif ditandai oleh terbentuknya merah-hijau atau violet-biru.

3.4.9 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan suatu metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan atau partisi. Untuk mendapatkan kondisi jenuh bejana kromatografi, dinding bejana dilapisi dengan lembaran kertas saring basah dan dalam bejana terdapat fase gerak setinggi 5-10 mm. Bejana ditutup dan dibiarkan selama satu jam (Harmita, 2006). Setelah jenuh, lempeng dimasukkan ke dalam bejana kromatografi dengan posisi tegak dan bercak terletak di atas permukaan fase gerak. bejana ditutup dan biarkan fase gerak naik mencapai tanda batas atas yang dibuat. Lempeng diangkat, dikeringkan, dan ditampakkan seperti yang disebutkan dalam monograf.



BAB 4

PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Bahan

Tumbuhan yang akan digunakan dideterminasi oleh Pusat Konservasi Tumbuhan-Kebun Raya Bogor, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Hasil determinasi dilakukan pada biji mahoni untuk memastikan bahwa bagian tanaman yang digunakan adalah benar-benar biji *Swietenia macrophylla* King. Setelah diperoleh, biji mahoni disortasi dengan cara mengupas kulit biji, seperti kemudian memisahkannya dengan simplisia yang rusak. Setelah disortasi, biji dikeringkan dengan pemanasan matahari tidak langsung, kemudian ditimbang untuk mengetahui berat bahan awal.

Simplisia yang telah kering disortasi kembali dari pengotor-pengotor yang tertinggal. Simplisia yang sudah disortir, dihaluskan hingga menjadi serbuk. Untuk mencegah kerusakan dan kemunduran mutu, serbuk simplisia disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya.

4.2 Ekstraksi Simplisia

Serbuk simplisia diekstraksi dengan cara panas, yaitu refluks karena tidak membutuhkan waktu yang lama. Pelarut yang digunakan adalah etanol 80 %. Etanol dengan air, memiliki kemampuan ekstraksi pada hampir semua senyawa bahan alam dengan bobot molekul rendah seperti alkaloid, saponin, dan flavonoid. Etanol biasanya dicampur dengan air, partikel tumbuhan mengembang dan meningkatkan porositas dinding sel yang akan memfasilitasi proses difusi bahan yang diekstraksi dari dalam sel ke luar sel. Untuk ekstraksi kulit kayu, akar, bagian kayu, dan biji idealnya digunakan alkohol-air dengan perbandingan 7:3 atau 8:2 (Samuelson, 1999).

Refluks dilakukan selama satu jam. Filtrat hasil ekstraksi kemudian disaring, ampasnya kemudian diekstraksi kembali hingga tiga kali. Filtrat yang diperoleh ditampung dan diuapkan di *rotary vacuum evaporator*. Penguapan dilakukan dengan suhu tidak lebih dari 55⁰C (Gaedcke, Barbara, & Helga, 2003). Ekstrak yang diperoleh kemudian ditimbang untuk

menghitung persen rendemen dan disimpan dalam lemari pendingin suhu 4⁰C untuk mencegah tumbuhnya mikroba yang tidak diinginkan. Hasil ekstraksi dan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.3.

4.3 Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim diuji untuk mengetahui apakah enzim tersebut masih memiliki aktivitas, aktivitas enzimatis ditetapkan dengan Internasional unit yaitu jumlah enzim yang dapat mengkatalis pembentukan 1 μ M produk dalam satu menit dibawah kondisi pH, temperatur, kekuatan ionik dan faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim (McPherson & Pincus, 2007).

Enzim yang digunakan sebesar 1,2 mg dengan spesifikasi enzim mengandung 26% protein dan 179 unit enzim/mg protein. Unit enzim dipilih berdasarkan batas unit enzim yang digunakan untuk pengujian yaitu 0,03 – 0,06 U/ml (Sigma Aldrich, 1996). Namun, berdasarkan hasil pengenceran pada konsentrasi 0,03 U/ml serapan lebih dari 0,8 maka enzim diencerkan lagi, sehingga diperoleh serapan optimum, yaitu 0,028 U/ml, jadi pengujian aktivitas enzimatis dilakukan dengan unit alfa-glukosidase 0,028U/ml.

Pengujian aktivitas enzimatis dilakukan dengan unit alfa-glukosidase 0,028 U/ml dan konsentrasi substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranososa 10 mM, pada pH 7,0, suhu 37⁰C, dan waktu inkubasi 15 menit (Kikkoman, 2011). Proses inkubasi terdiri dari dua tahap. Tahap pertama, inkubasi 5 menit bertujuan untuk memberikan waktu bagi larutan uji untuk mencapai suhu 37⁰C. Tahap kedua, inkubasi dilakukan 15 menit yang merupakan waktu inkubasi untuk reaksi enzimatis. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan natrium karbonat (Kikkoman, 2011). Produk yang dihasilkan dari reaksi antara alfa-glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranososa diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400 nm (Kikkoman, 2011).

Untuk mengoreksi hasil serapan blanko (kontrol), pengamatan dilakukan terhadap aktivitas enzim dengan menukar posisi antara enzim α -glukosidase dan natrium karbonat. Hasil yang diperoleh dari kontrol dapat digunakan untuk melihat apakah aktivitas enzim telah berhenti saat kondisi

campuran telah dibasakan terlebih dahulu dengan natrium karbonat sehingga tidak ada lagi produk yang masih terbentuk. Berdasarkan hasil uji, diperoleh aktivitas enzim sebesar 25,24 U/mg. Nilai aktivitas enzim pada uji pendahuluan dapat dilihat pada Tabel 4.4.

4.4 Optimasi Enzim

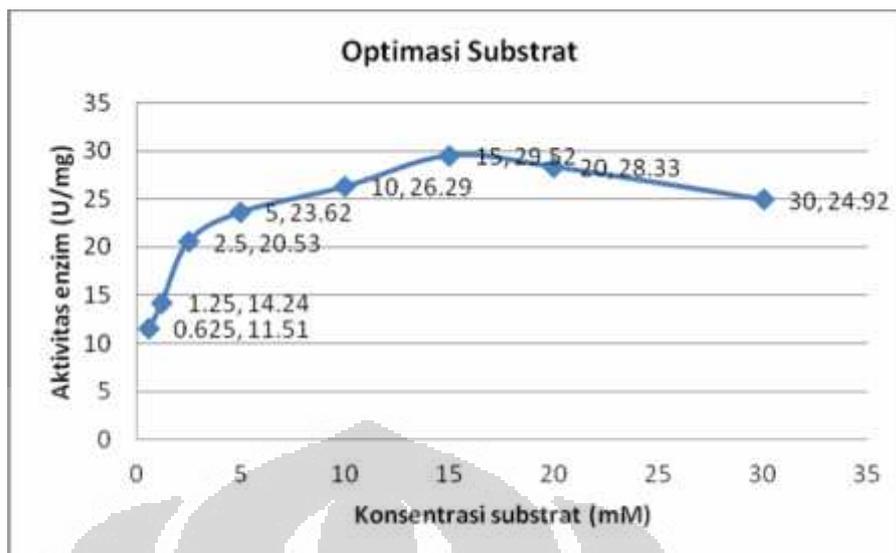
Pada optimasi enzim dilakukan beberapa variasi terhadap pH, waktu inkubasi dan Substrat. Variasi pH yang digunakan adalah pH 6,8 (Sigma Aldrich, 1996; Andrade-Cetto, Becerra-Jimenez, & Cardenas-Vazquez, 2007; Shinde, J., et al. 2008), pH 7,0 (Hsiu-Hui Chan, Han-Dong Sun, & Reddy, 2010; Kim, Nam, dan Kurihara, 2008), dan pH 7,2 (Ghadyale, Takalikar, & Haldavnekar, 2011). Variasi waktu inkubasi yang digunakan adalah 15 menit (Kikkoman, 2011), 20 menit (Sigma Aldrich, 1996; Shinde, J., et al. 2008; Hsiu-Hui Chan, Han-Dong Sun, & Reddy, 2010), dan 30 menit (Kim, Nam, & Kurihara, 2008). Sedangkan variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, dan 20 mM.

Variasi pH yang digunakan adalah 6,8, 7,0, dan 7,2 dengan unit alfa-glukosidase 0,028 U/ml dan konsentrasi substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida 10 mM, pada suhu 37⁰C, dan waktu inkubasi 15 menit. Peningkatan aktivitas enzimatis terjadi pada peningkatan pH 6,8; 7,0; dan 7,2 dengan aktivitas enzim berturut-turut 19,32 U/mg, 24,96 U/mg, dan 462,57 U/mg. Namun, pada pH 7,2 serapan yang diperoleh 0,9365, sehingga dari variasi pH yang diuji, diperoleh serapan optimum pada pH 7,0, yaitu sebesar 0,5085 dengan aktivitas enzim sebesar 24,96 U/mg. Hasil optimasi pH dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Variasi waktu inkubasi yang digunakan adalah 15, 20, dan 30 menit dengan unit alfa-glukosidase 0,028 U/ml dan konsentrasi substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida 10 mM, pada suhu 37⁰C, dan pH 7,0 yaitu pH optimum. Peningkatan aktivitas enzimatis terjadi pada peningkatan waktu inkubasi 15, 20, dan 30 menit dengan aktivitas enzim berturut-turut 24,96 U/mg, 40,07 U/mg, dan 65,27 U/mg. Namun pada waktu inkubasi 20 menit

serapan yang diperoleh 0,816 dengan aktivits enzim 40,07 U/mg dan pada waktu inkubasi 30 menit serapan yang diperoleh 1,239 dengan aktivits enzim 65,27 U/mg, sehingga dari variasi waktu inkubasi yang diuji, diperoleh serapan optimum pada waktu inkubasi 15 menit dengan serapan 0,5085 dan aktivitas enzim sebesar 24,96 U/mg. Hasil optimasi waktu inkubasi dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, dan 30 mM dengan unit alfa-glukosidase 0,028 U/ml dan konsentrasi substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranososa 10 mM, pada suhu 37⁰C, dan pH 7,0 yaitu pH optimum dan waktu inkubasi optimum yaitu 15 menit. Peningkatan aktivitas enzimatis terjadi pada peningkatan konsentrasi substrat 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM yaitu 11,508 U/mg, 14,24 U/mg, 20,53 U/mg, 23, 62 U/mg, 26,29 U/mg, dan menurun pada konsentrasi substrat 20 mM dan 30 mm masing-masing tu 28,33 U/mg dan 24,92 U/mg. Penurunan aktivitas diperkirakan karena terbentuknya produk inhibitor dari reaksi enzim. Produk inhibitor tersebut adalah α -D-glukosa dan p-nitrofenil yang dapat menghambat aktivitas enzim. Kedua produk tersebut memiliki kemiripan struktur dengan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranososa sehingga dapat berperan sebagai produk inhibitor. Berdasarkan hasil yang diperoleh, konsentrasi substrat yang digunakan untuk uji penghambatan aktivitas alfa-glukosidase adalah 15 mM dengan Aktivitas enzim 29,52 U/mg. Hasil optimasi konsentrasi substrat dapat dilihat pada Tabel 4.7.



Gambar 4.1 Grafik optimasi aktivitas enzim dengan variasi konsentrasi substrat

Penurunan aktivitas ini karena terbentuknya produk inhibitor kompetitif dari reaksi enzim-substrat yang menghambat aktivitas enzim (Bisswanger, 2002), seperti α -D-glukosa dan p-nitrofenil yang memiliki kemiripan struktur dengan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida, sehingga dapat bersaing dengan substrat untuk menempati *active site* dari enzim. Berdasarkan hasil yang diperoleh, konsentrasi substrat yang digunakan untuk uji penghambatan aktivitas alfa-glukosidase adalah 15 mM.

4.5 Uji Penghambatan Aktivitas Enzim

Uji penghambatan aktivitas alfa-glukosidase dilakukan menggunakan larutan enzim dengan unit alfa-glukosidase 0,028 U/ml dan konsentrasi substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida 15 mM, pada suhu 37°C, dan waktu inkubasi 15 menit. Pengujian dilakukan dengan variasi konsentrasi ekstrak pada setiap fraksi yaitu fraksi petroleum eter, fraksi etil asetat, fraksi butanol, dan fraksi air dengan tujuan mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak terhadap daya hambat enzim dari setiap fraksi.

Uji penghambatan aktivitas enzim dilakukan dengan mengukur serapan produk, yaitu p-nitrofenol pada panjang gelombang 400 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Pengujian dilakukan pada larutan

Blanko (B_1), kontrol blanko (B_0), sampel (S_1), kontrol sampel (S_0), pembanding yaitu akarbose (A_1), dan kontrol pembanding akarbose (A_0).

Pengujian larutan blanko dan Kontrol blanko dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim tanpa penambahan ekstrak. Pengujian blanko dan kontrol blanko dilakukan setiap hari pengujian karena pada penyimpanan larutan enzim dapat menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas enzim.

Pengujian larutan sampel untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas enzim oleh ekstrak, sedangkan pengujian kontrol sampel dilakukan sebagai faktor koreksi terhadap larutan sampel. Begitu pula pengujian larutan pembanding yaitu larutan akarbose untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas enzim oleh akarbose dan pengujian kontrol pembanding akarbose dilakukan sebagai faktor koreksi terhadap larutan akarbose. Pada pengujian larutan sampel, nilai serapan bisa saja tidak murni berasal dari p-nitrofenol tetapi dapat dipengaruhi oleh serapan sampel yang berwarna yang dapat memberikan nilai serapan pada panjang gelombang pengukuran yang digunakan. Maka, pengujian kontrol sampel diperlukan untuk menghilangkan nilai serapan dari ekstrak yang berwarna tanpa adanya aktivitas enzim karena telah dibasakan oleh natrium karbonat.

Pembanding yang digunakan adalah akarbose dengan konsentrasi 1%, 0,5%, 0,25%, dan 0,125%. Hasil pengujian menunjukkan bahwa akarbose memiliki efek penghambatan alfa-glukosidase dengan IC_{50} 225,35 $\mu\text{g/ml}$. Hasil uji penghambatan akarbose dapat dilihat pada tabel 4.8. Berdasarkan beberapa pengujian terhadap akarbose pada penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, kemampuan akarbose menghambat Alfa-glukosidase dari *S. cerevisiae* menunjukkan IC_{50} sebesar 17 mg/ml setara dengan 0,017 $\mu\text{g/ml}$ (L.J. Shai *et al.*, 2010), 1,05 mM setara dengan 677,50 $\mu\text{g/ml}$ (S.H. Lee *et al.*, 2010), 677,97 μM atau setara dengan 437,46 $\mu\text{g/ml}$ (Chan, Sun, Reddy, & Wu, 2010), 128 $\mu\text{g/ml}$ (Andrade-Cetto, Becerra-Jimenez, & Cardenas-Vazquez, 2007). Selain itu, akarbose juga pernah dilaporkan tidak memiliki aktivitas penghambatan pada alfa-glukosidase

yang berasal dari *S. cerevisiae* dan *B. stearothermophilus* (Kim, K.Y., Nam, Kurihara, & Kim, S.M., 2008, Shinde et al., 2008).

Berdasarkan beberapa pengujian terhadap akarbose pada penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, akarbose lebih efektif dalam menghambat alfa-glukosidase yang berasal dari mamalia, seperti sukrase dan maltase (Kim, Nam, dan Kurihara, 2008; Shinde et al., 2008). Hasil pengujian menggunakan enzim tidak dapat dibandingkan antara satu nilai dengan nilai yang lain kecuali digunakan kondisi pengujian yang sama (McPherson & Pincus, 2007).

Hasil pengujian pada semua fraksi menunjukkan adanya hambatan aktivitas alfa-glukosidase. Tabel 4.9 sampai Tabel 4.12 memperlihatkan hasil uji penghambatan aktivitas alfa-glukosidase pada setiap fraksi. Nilai hambatan ditetapkan dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi sampel yang diperlukan untuk dapat menghambat 50% aktivitas enzim (S.H. Lee et al, 2010).

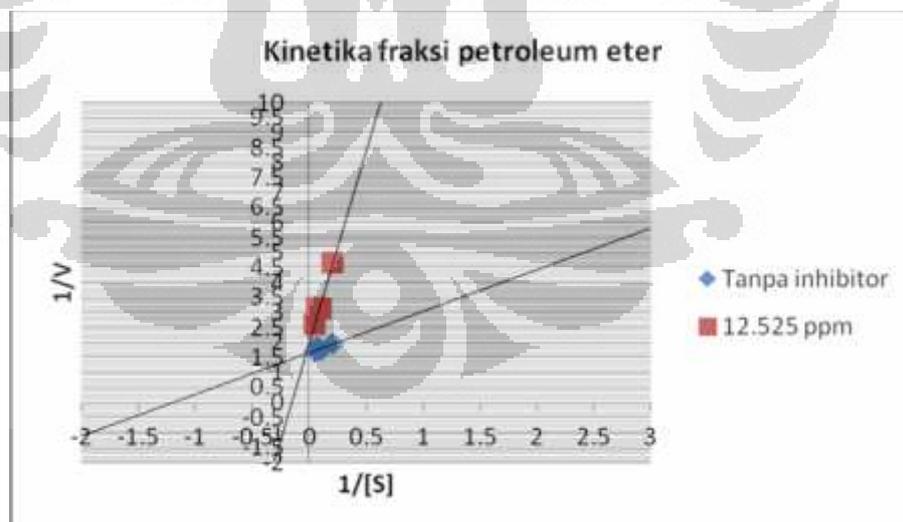
Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh dari pengujian, semua fraksi memperlihatkan penghambatan aktivitas enzim yang lebih baik dibandingkan akarbose. Empat fraksi yaitu fraksi petroleum eter, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi butanol memiliki penghambatan aktivitas alfa-Glukosidase berturut-turut dengan nilai IC_{50} 15,44 ppm, 38,40 ppm, 57,84 ppm, dan 88,51 ppm. Fraksi petroleum eter memiliki IC_{50} paling kecil. Berdasarkan beberapa pengujian penghambatan aktivitas alfa-glukosidase pada penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya fraksi yang memiliki penghambatan terbesar adalah fraksi etil asetat (Kim, K.Y., Nam, Kurihara, & Kim, S.M., 2008; Wang, Du, dan Song, 2010), fraksi etanol (Ryu, et al., 2011), dan fraksi butanol (Lam, Chen J.M., Kang, & Chen C.H, Lee, 2008), sedangkan penghambatan aktivitas alfa-glukosidase pada fraksi petroleum eter belum pernah dilaporkan.

4.6 Uji Kinetika Penghambatan Enzim

Uji kinetika penghambatan enzim dilakukan dengan menggunakan plot Lineweaver-Burk yang dapat menunjukkan jenis penghambatan enzim

oleh sampel uji. fraksi yang digunakan adalah fraksi petroleum eter dengan konsentrasi 50,1 ppm, 25,05 ppm, 12,525 ppm, 6,263 ppm. Fraksi petroleum eter dipilih berdasarkan pengujian yang telah dilakukan, fraksi ini memiliki penghambatan aktivitas alfa-glukosidase paling baik dibandingkan fraksi lainnya. konsentrasi substrat yang digunakan adalah 20 mM, 15 mM, 10 mM, dan 5 mM. data hasil uji kinetika dapat dilihat pada Tabel 4.13.

Berdasarkan hasil plot Lineweaver-burk (Gambar 4.2), saat $1/[S]$ mendekati 0, kecepatan maksimum reaksi (V_{max}) tidak dipengaruhi oleh adanya inhibitor. Maka pada saat konsentrasi substrat tinggi, V_{max} pada sistem dengan inhibitor sama dengan atau mendekati V_{max} dengan sistem tanpa inhibitor. Inhibitor yang bekerja secara kompetitif tidak mempengaruhi nilai V_{max} , tetapi meningkatkan nilai K_m (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003). Berdasarkan persamaan yang diperoleh, nilai V_{max} dan K_m dapat ditentukan. Pada sistem tanpa inhibitor diperoleh persamaan $y = 1,67 + 1,39 x$ dengan nilai V_{max} 0,59 dan nilai K_m 0,83. Sedangkan pada sistem dengan inhibitor 12,525 ppm. diperoleh persamaan $y = 2,02 + 12,93 x$ dengan nilai V_{max} 0,49 dan nilai K_m 6,40.



Gambar 4.2 Plot Lineweaver-Burk hasil uji kinetika pada fraksi petroleum eter

Hasil uji kinetika penghambatan enzim menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter biji Mahoni (*Swietenia macrophylla* King) memiliki

mekanisme penghambatan kompetitif. Pernyataan tersebut dapat dilihat dari hasil plot kurva Lineweaver-Burk antara sistem tanpa inhibitor dengan sistem fraksi petroleum eter dengan konsentrasi 12,525 ppm yang menunjukkan penghambatan kompetitif. Inhibitor yang memiliki mekanisme penghambatan kompetitif memiliki struktur senyawa yang menyerupai substrat atau disebut sebagai analog substrat (Murray, Granner, & Mayes, 2003).

4.7 Identifikasi Kandungan Kimia

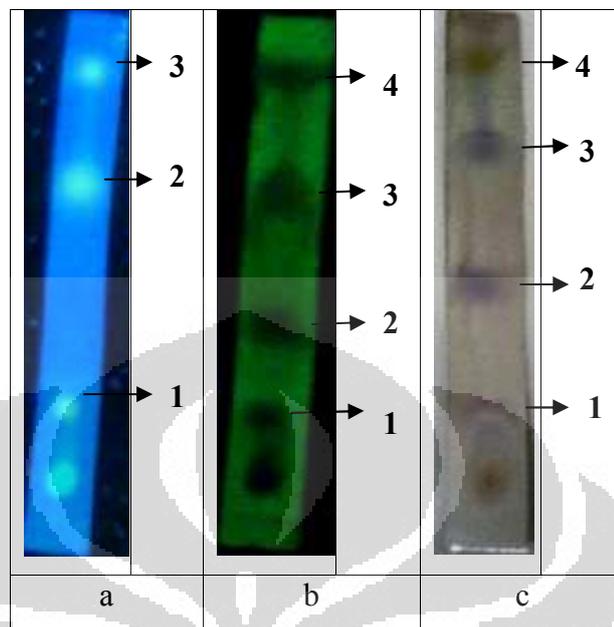
Identifikasi golongan senyawa kimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa dalam setiap fraksi yang diuji meliputi alkaloid, glikosida, flavonoid, terpen, tanin, saponin, dan kuinon. Hasil identifikasi kandungan kimia setiap fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.14.

Glikosida merupakan suatu senyawa, bila dihidrolisis akan terurai menjadi gula (glikon) dan senyawa lain (glikon atau genin) (Sirait, 2007). Pada proses identifikasi glikosida, gula hasil hidrolisis dapat diidentifikasi dengan tes Mollisch. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin ungu. Berdasarkan hasil identifikasi senyawa glikosida, gula hasil hidrolisis terkandung pada fraksi etil asetat, butanol, dan air.

Senyawa terpen umumnya merupakan senyawa yang larut dalam lemak (Harborne, 1987). Maka berdasarkan tingkat kelarutannya, dalam pengujian golongan senyawa, terpen ditarik dengan eter. Terpen dapat diidentifikasi dengan tes Liebermann-Bouchard. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, merah muda, atau violet (Farnsworth, 1966). Berdasarkan hasil identifikasi, terpen terkandung pada fraksi petroleum eter, etil asetat, dan butanol. Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan senyawa seskuiterpen yang diisolasi dari *Lactuca indica* L. dan triterpen dari *Centella asiatica* diketahui memiliki penghambatan aktivitas alfa-glukosidase (Jung, Park, & Lee, 2006).

Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan KLT menggunakan eluen benzen : etil asetat (8:2) dan terbentuk noda berwarna pada fraksi petroleum eter. Hasil KLT fraksi petroleum eter dengan penampak noda Vanilin-

H₂SO₄ ditunjukkan pada Gambar 4.3 dan fraksi petroleum eter dengan penampak noda Liebermann-Burchard ditunjukkan pada Gambar 4.4.

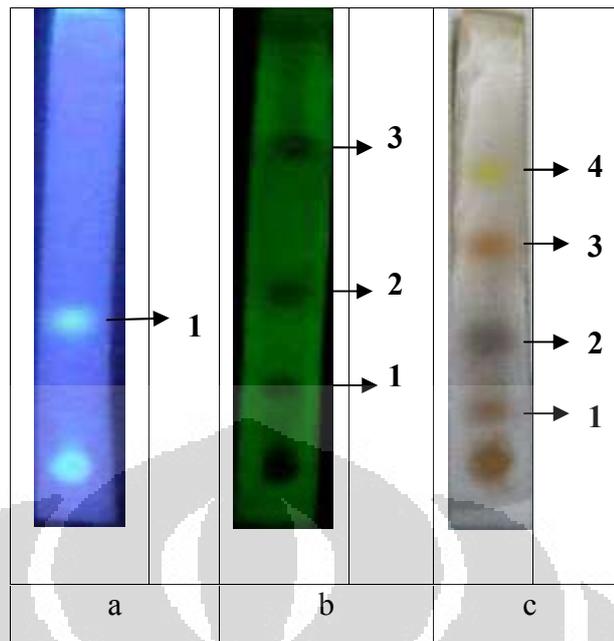


Keterangan : Hasil KLT fraksi petroleum eter (a) di bawah sinar UV 366 nm dan fraksi petroleum eter (b) di bawah sinar UV 254 nm dan (c) fraksi petroleum eter dengan penampak noda Vanilin-H₂SO₄ yang dipanaskan

Gambar 4.3 Hasil KLT fraksi petroleum eter dengan eluen benzene : etil asetat (8:2) dengan penampak noda Vanilin-H₂SO₄

Tabel 4.1 Hasil KLT senyawa terpen pada fraksi petroleum eter dengan eluen benzene : etil asetat (8:2) dan penampak noda Vanilin-H₂SO₄

No noda	Warna noda dengan lampu UV 366 nm	Rf tiap noda	Warna noda dengan lampu UV 254 nm	Rf tiap noda	Warna noda setelah disemprot vanilin-H ₂ SO ₄	Rf tiap noda
1	Hijau	0,14	Coklat	0,14	Ungu	0,14
2	Hijau	0,55	Coklat	0,33	Ungu tua	0,4
3	Hijau	0,77	Coklat	0,55	Ungu tua	0,54
4	-	-	Coklat	0,77	Kuning	0,78



Keterangan : Hasil KLT fraksi petroleum eter (a) di bawah sinar UV 366 nm dan fraksi etil asetat (b) di bawah sinar UV 254 nm dan (c) fraksi etil asetat dengan penampakan noda Liebermann-Burchard yang dipanaskan

Gambar 4.4 Hasil KLT fraksi petroleum eter dengan eluen benzene : etil asetat (8:2) asetat dengan penampakan noda Liebermann-Burchard

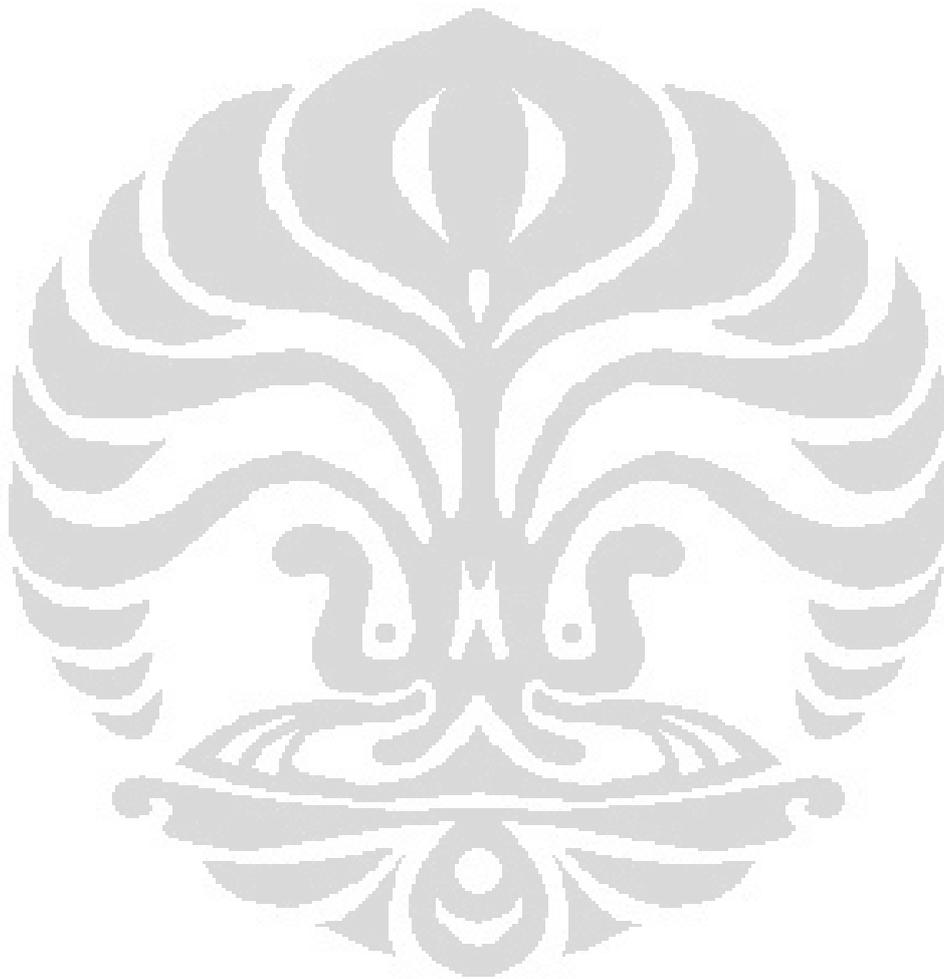
Tabel 4.2 Hasil KLT senyawa terpen pada fraksi petroleum eter dengan eluen benzene : etil asetat (8:2) dan penampakan noda Liebermann-Burchard

No noda	Warna noda dengan lampu UV 366 nm	Rf tiap noda	Warna noda dengan lampu UV 254 nm	Rf tiap noda	Warna noda setelah disemprot Liebermann-Burchard	Rf tiap noda
1	Hijau	0,28	Coklat	0,17	Coklat muda	0,1
2	-	-	Coklat	0,27	Ungu kehitaman	0,21
3	-	-	Coklat	0,6	Orange	0,36
4	-	-	-	-	Kuning	0,54

Fraksi petroleum eter dari ekstrak biji mahoni diuji secara kromatografi lapis tipis (KLT) tujuannya adalah untuk memastikan hasil penapisan fitokimia dari fraksi teraktif yang memiliki penghambatan aktivitas alfa-glukosidase terbesar. Eluen yang digunakan adalah benzen :

Universitas Indonesia

etil asetat (8:2). Hasil penapisan menunjukkan setelah di semprot dengan penampak noda Vanilin- H_2SO_4 kemudian dipanaskan memperlihatkan empat noda berwarna dan memiliki nilai R_f 0,14-0,78 dan dengan penampak noda Liebermann-Burchard juga memperlihatkan empat noda berwarna dengan nilai R_f 0,1-0,54.



BAB 5

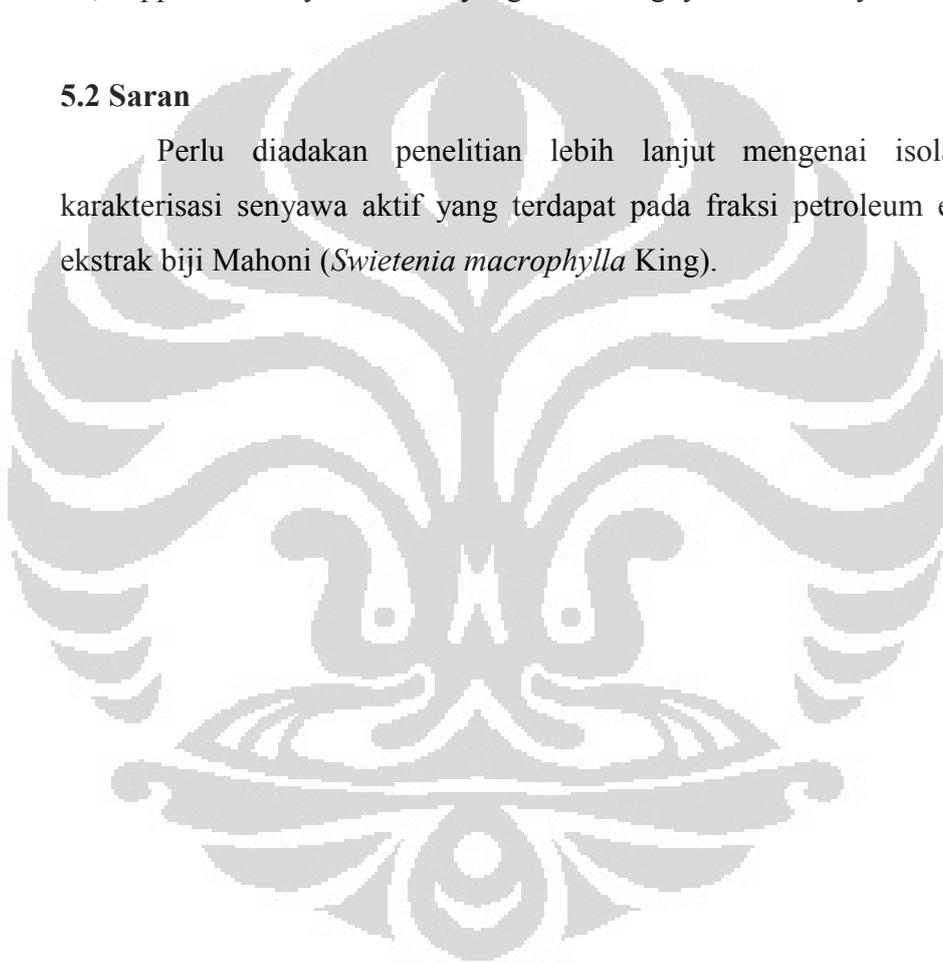
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Hasil uji penghambatan aktivitas alfa-glukosidase menunjukkan bahwa ekstrak biji Mahoni (*Swietenia macrophylla* King) dari fraksi petroleum eter memiliki penghambatan yang paling baik dengan nilai IC_{50} 15,44 ppm dan senyawa kimia yang dikandungnya adalah senyawa terpen.

5.2 Saran

Perlu diadakan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi dan karakterisasi senyawa aktif yang terdapat pada fraksi petroleum eter dari ekstrak biji Mahoni (*Swietenia macrophylla* King).



DAFTAR ACUAN

- Ali, K.M., Chatterjee K., De D., Jana K., Bera T.K., Gosh D. (2011). Inhibitory effect of hydro-methanolic extract of seed of *Holarrhena antidysenterica* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose level in normoglycemic rat. *Journal of Ethnopharmacology* 135: 194–196.
- Andrade-Cetto, A., Becerra-Jimenez, J., Cardenas-Vazquez, R. (2008). Alfa-glucosidase inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 27-32.
- American College of Physicians. *ACP Diabetes Care Guide : Oral Diabetes Drugs*. Agustus 23, 2011. http://diabetes.acponline.org/custom_resources/ACP_DiabetesCareGuide_Ch07.pdf?dbp
- Bisswanger, Hans. (2002). *Enzyme Kinetics Principles and Methodes*. Wiley-VCH :Jerman.
- Hsiu-Hui Chan, Han-Dong Sun, Reddy, M.V.B, Tian-Shung Wua. (2010). Potent α -glucosidase inhibitors from the roots of *Panax japonicus* C. A. Meyer var. major. *Phytochemistry* 71 :1360–1364.
- Chan, K.C., Tang, T.S, dan Toh, H.T. (1976). Isolation of swietenolide diacetat from *Swietenia macrophylla*. *Phytochemistry* 15 : 429-430.
- Cheng, A.Y.Y, Robert, G.J. (2004). Intestinal Absorbtion Inhibitors in The Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrinology Rounds*. Volume 4. Issue 7.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., dan Ferrier, D.R. (2005). *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Cihan, A. C., Ozcan, B., Tekin, N., dan Cokmus, C. (2010). *Characterization of a thermostable α -glucosidase from Geobacillus thermodenitrificans F84a*. Formatex.
- Connolly, J.D., McCrindle, K.H. Overtone dan Warnock. (1965). *Swietenolide*. *Tetrahedron Lett.*, 6: 2937-2940.

- Corwin, E.J. (2008). *Handbook of Pathophysiology* (3rd ed.). USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Materia Medika Indonesia Jilid IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen kesehatan RI. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen kesehatan RI, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat pengawasan Obat Tradisional.
- Departemen Kesehatan. (2005). *Pharmaceutical Care Untuk Diabetes Mellitus*. Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan Departemen Kesehatan RI.
- Dewi, R.T., et al. (2007). Inhibitory effect of Koji *Aspergillus terreus* on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Pakistan Journal of Biological Science*, 18, 3131-3135.
- Dipiro, J.T., Talbert, R.L., Yees, G.C., Matzke, G.R., Wells, B.G., & Posey, L.M. (3rd ed). (1997). *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*. New York: McGraw-Hill.
- Farnsworth, N.R. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Science* 55, 3, 226-276.
- Gaedcke, F., Barbara S, dan Helga, B. (2003). *Herbal Medicinal Products. Scientific and Regulatory Basis For Development, Quality Assurance and Marketing Authorisation*. Scientific Publishers Stuttgart.
- Ghadyale, V., Takalikal, S., Haldavnekar, V., dan Arvindekar, A., (2011). Effective Control of Postprandial Glucose Level through Inhibition of Intestinal Alpha Glucosidase by *Cymbopogon martinii* (Roxb.). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Gin, H. dan Rigalleau, V., (2000). Post-Prandial Hyperglycemia. Post-Prandial Hyperglycemia And Diabetes. *Review : Diabetes & Metabolism* : 265-272.

- Goh, B.H. dan Habsah, A.K. (2011). *In vitro* cytotoxic potential of *Swietenia macrophylla* King seeds against human carcinoma cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research*. Vol. 5(8), pp. 1395-1404.
- Harmita. (2006). *Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- International Diabetes Federation. *World Diabetes Day 2003*. Oktober 2, 2011. <http://www.idf.org/node/1166>.
- Jung, Park, Lee, Kang, Kim. (2006). Antidiabetic Agents from Medicinal Plant. *Current Medicinal Chemistry*, 13 :1203-1218.
- Katzung G. Bertram. (2008). *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG.
- Kim, K.Y., Nam, K.A., Kurihara, H., dan Kim, S.M. (2008). Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry* 69, 2820–2825.
- Kikkoman Corporation. (2001). *α -Glucosidase (α GLS-SE)*. September 4, 2010. http://biochemifa.kikkoman.co.jp/products/rinsyou/pdf/27_alphagl_sse.pdf.
- Kumar, S., Smita, N., Vipin, K., Prakash, O. (2010). *α -glucosidase inhibitors from plants : A natural approach to treat diabetes*. *Pharmacognosy Review*. Vol. 5.
- L.J. Shai et al. (2010). Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa. South Africa. *Journal of Botany* 76 : 465–470.
- Maiti, A., Dewanjee. S., Mandal, S.C. (2007). In Vivo Evaluation of Antidiarrhoeal Activity of the Seed of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6 (2): 711-716.
- Maiti, A., Dewanjee, S., Jana, G., Mandal, S.C. (2008). Hypoglycemic effect of *Swietenia macrophylla* seeds against type II diabetes. *International Journal of Green Pharmacy*.

- Martindale. (2007). *The Complete drug Reference*. The Pharmaceutical Press.
- Mashita, M. (2011). *Skrining Aktifitas Penghambatan Enzim α -Glukosidase dan Penapisan Fitokimia beberapa Tanaman Obat yang Digunakan Sebagai Antidiabetes*. Skripsi FMIPA UI.
- McPherson, R.A., Pincus, M.R. (2007). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* (21st ed). Saunders Elsevier.
- Meisenberg, G. William H.S. *Principles of Medical Biochemistry* (2nd ed). (2006). Mosby Elsevier : Philadelphia.
- Mootoo, B.S., Ali, A., Motilal, R., Pingal, dan Ramlal A. (1999). Limonoids from *Swietenia macrophylla* and *S. aubrevilleana*. *J. Nat. Prod.*, 62 : 1514-1517.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., & Rodwell, V.W. (2003). *Illustrated Biochemistry* (26th ed.). New York: Mc Graw Hill.
- Prashanth, D., Amit, A., Samiulla, D.S., Asha, M.K., Padmaja, R. (2001). α -Glucosidase inhibitory activity of *Mangifera indica* bark. *Fitoterapia* : 686-688.
- Ryu, W.H. *et al.* (2011). α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of prenylated xanthenes from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry*.
- Samuelsson, G. (1999). *Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy*. (4th ed.). Swedia: Apotekarsocieteten.
- Shinde, J., et al. (2008). α -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) Rats. *Carbohydrate research*, (343), 1278-1281.
- S.H. Lee et al, (2010), Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits α -glucosidase and α -amylase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice, *Food and Chemical Toxicology* : 2633–2637.
- Sirait, Midian. (2007). *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*. Bandung: Penerbit: ITB.

- Sigma Aldrich. (1996). *Enzymatic Assay of α -Glucosidase*. September 21, 2011. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_info.
- Soerianegara, dan Lemmens, R.H.M.J. (1994). *Plant Resources of South-East Asia 5. (1) Timber trees: Major commercial timber*. Bogor Indonesia.
- Solomon, K.A., Malathi, R., Rajan, S.S., Narasimhan, S., dan Nethaji, M. (2003). Swietenine. *Acta Cryst. E*, 59 : 1519-1521.
- Standl, E. G, Schernthaner, J. Rybka, M. Hanafeld, S.A. Raptis, L. Naditch. (2001). Improved glycaemic control with miglitol inadequately-controlled type 2 diabetics. *Diabetes Research and Clinical Practice* 52 (2001) 205–213.
- United States Departemen of Agricultur. *Resources Conservation Service Natural*. Agustus 22, 2011. <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=SWMA> .
- Van de Laar FA. Lucassen, PLBJ, Akkermans, RP, Van de Lisdonk, EH, Rutten GEHM, Van Weel C. (2005). Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus (Review). *The Cochrane Collaboration* : John Wiley & Sons, Ltd.
- Wang, H., Du, Y.J., Song, H.C. (2010). α -Glucosidase and α -Amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry* : 6-13.
- Wells, B.G., Dipiro, J.T., Schwinghammer, T.L., dan Hamilton, C.W. (2003). *Pharmacotherapy Handbook* (5th ed). The McGraw-Hill.
- World Health Organization. (2011, Agustus). Diabetes. September 5, 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>.
- Zimmet P., K. G. M. M. Alberti, dan Jonathan Shaw. (2001). Global and societal implication of the diabetes epidemic. *Insight Review Article*



Gambar 4.5 Biji mahoni
(*Swietenia macrophylla* King)



Gambar 4.6 Biji mahoni
(*Swietenia macrophylla* King)
tanpa kulit biji



Gambar 4.7 Ekstrak biji mahoni dari fraksi petroleum Eter



Gambar 4.8 Ekstrak biji mahoni dari fraksi etil asetat



Gambar 4.9 Ekstrak biji mahoni dari fraksi butanol



Gambar 4.10 Ekstrak biji mahoni dari fraksi air

				
Ekstrak Biji Mahoni dari Fraksi Petroleum eter	Ekstrak Biji Mahoni dari Fraksi etil asetat	Ekstrak Biji Mahoni dari Fraksi Butanol	Ekstrak Biji Mahoni dari Fraksi Air	Standar

Keterangan : Standar = Nerii Folium

Gambar 4.11 Penapisan glikosida menggunakan pereaksi Mollish

			
Ekstrak Biji Mahoni dari Fraksi petroleum eter	Ekstrak Biji Mahoni dari Fraksi Etil asetat	Ekstrak Biji Mahoni dari Fraksi Butanol	Standar

Keeterangan : Standar = Citri Hystricis Perikarpium

Gambar 4.12 Penapisan terpen menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard

Tabel 4.3 Rendemen tanaman uji

No	Nama Tanaman Uji	Serbuk (g)	Ekstrak kering (g)	Rendemen (%)
1	Biji Mahoni	875	150	17,14

Tabel 4.4 Optimasi aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat 10 mM, pH 7,0, suhu 37⁰C, dan waktu inkubasi 15 menit

Konsentrasi Substrat		Absorbansi		Absorbansi	U-K	Aktivitas Enzim	
		A1	A2	Rata-rata		U/ml	U/mg
10 mM	Uji (U)	0,603	0,589	0,596	0,514	0,3029	25,24
	Kontrol (K)	0,087	0,077	0,082			

Keterangan : A1 = serapan 1; A2 = serapan 2; U-K = uji – kontrol

Tabel 4.5 Optimasi pH dengan konsentrasi substrat 10 mM, suhu 37⁰C, dan waktu inkubasi 15 menit

pH		Absorbansi (A)		Absorbansi Rata-rata	U-K	Aktivitas Enzim	
		A1	A2			U/ml	U/mg
6,8	Uji (U)	0,438	0,471	0,4545	0,3935	0,2318	19,32
	Kontrol (K)	0,061	0,061	0,061			
7,0	Uji (U)	0,603	0,589	0,596	0,5085	0,2996	24,96
	Kontrol (K)	0,087	0,088	0,0875			
7,2	Uji (U)	0,864	1,114	0,989	0,9365	5,5496	462,47
	Kontrol (K)	0,057	0,048	0,0525			

Keterangan : A1 = serapan 1; A2 = serapan 2; U-K = uji – kontrol

Tabel 4.6 Optimasi Waktu inkubasi dengan konsentrasi substrat 10 mM, dan pH 7,0, dan suhu 37⁰C

Waktu inkubasi		Absorbansi (A)		Absorbansi Rata-rata	U-K	Aktivitas Enzim	
		A1	A2			U/ml	U/mg
15 menit	Uji (U)	0,589	0,578	0,596	0,5085	0,2996	24,96
	Kontrol (K)	0,087	0,077	0,0875			
20 menit	Uji (U)	0,805	0,861	0,833	0,816	0,4808	40,07
	Kontrol (K)	0,015	0,019	0,017			
30 menit	Uji (U)	1,346	1,177	1,2615	1,239	0,7832	65,27
	Kontrol (K)	0,026	0,019	0,0225			

Keterangan : A1 = serapan 1; A2 = serapan 2; U-K = uji – kontrol

Tabel 4.7 Optimasi Substrat dengan pH 7,0 dan waktu inkubasi 15 menit, dan suhu 37⁰C

Konsentrasi Substrat		Absorbansi (A)		Absorbansi Rata-rata	U-K	Aktivitas Enzim	
		A1	A2			U/ml	U/mg
30 m M	Uji (U)	0,632	0,620	0,626	0,5075	0,299	24,92
	Kontrol (K)	0,118	0,119	0,1185			
20 mM	Uji (U)	0,645	0,647	0,646	0,577	0,34	28,33
	Kontrol (K)	0,071	0,067	0,069			
15 mM	Uji (U)	0,720	0,585	0,652	0,601	0,3542	29,52
	Kontrol (K)	0,044	0,058	0,051			
10 mM	Uji (U)	0,589	0,578	0,5835	0,5355	0,3155	26,29
	Kontrol (K)	0,087	0,077	0,082			
5 mM	Uji (U)	0,519	0,496	0,5075	0,481	0,2834	23,62
	Kontrol (K)	0,024	0,029	0,0265			
2,5 mM	Uji (U)	0,448	0,422	0,435	0,418	0,2463	20,53
	Kontrol (K)	0,016	0,017	0,0165			
1,25 mM	Uji (U)	0,307	0,322	0,3145	0,290	0,1709	14,24
	Kontrol (K)	0,020	0,029	0,0245			
0,625 mM	Uji (U)	0,249	0,242	0,2455	0,2345	0,1381	11,508
	Kontrol (K)	0,013	0,009	0,011			

Keterangan : A1 = serapan 1; A2 = serapan 2; U-K = uji - kontrol

Tabel 4.8 Aktivitas penghambatan alfa-glukosidase pada akarbose

Konsentrasi		Absorbansi		Absorbansi	S1-S0	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
		A1	A2	Rata-rata			
1% (50,25µg/ml)	Uji	0,527	0,543	0,535	0,4535	13,70	225,35
	Kontrol	0,085	0,078	0,0815			
0,50% (25,125µg/ml)	Uji	0,534	0,528	0,531	0,456	13,22	
	Kontrol	0,073	0,077	0,075			
0,25% (12,563µg/ml)	Uji	0,545	0,575	0,560	0,487	7,32	
	Kontrol	0,077	0,069	0,073			
0,125% (6,281µg/ml)	Uji	0,580	0,584	0,582	0,502	4,47	
	Kontrol	0,083	0,077	0,08			
B (Blanko)	Uji	0,625	0,584	0,6045	0,5255		
	Kontrol	0,075	0,083	0,079			
Persamaan regresi					y = 4,93 + 0,20 x		

Keterangan : A1 = serapan 1; A2 = serapan 2; S1 = sampel; S0 = kontrol sampel;
 IC₅₀ = konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.9 Aktivitas penghambatan alfa-glukosidase dari fraksi petroleum eter

Konsentrasi		Absorbansi		Absorbansi Rata-rata	S1-S0	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
		A1	A2				
1 % (50,1µg/ml)	Uji	0,223	0,251	0,237	0,050	91,63	15,44
	Kontrol	0,188	0,186	0,187			
0,5% (25,05µg/ml)	Uji	0,284	0,328	0,306	0,186	68,89	
	Kontrol	0,123	0,117	0,120			
0,25% (12,525µg/ml)	Uji	0,372	0,537	0,4545	0,3535	40,88	
	Kontrol	0,116	0,086	0,101			
0,125% (6,263µg/ml)	Uji	0,529	0,502	0,5155	0,3646	39,03	
	Kontrol	0,145	0,157	0,151			
B (Blanko)	Uji	0,686			0,598		
	Kontrol	0,088					
Persamaan regresi					y = 30,39 + 1,27 x		

Keterangan : A1 = serapan 1; A2 = serapan 2; S1 = sampel; S0 = kontrol sampel;
 IC₅₀ = konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.10 Aktivitas penghambatan alfa-glukosidase dari fraksi etil asetat

Konsentrasi		Absorbansi		Absorbansi Rata-rata	S1-S0	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)	
		A1	A2					
1 % (50,1µg/ml)	Uji	0,776	0,738	0,757	0,3425	43,57	57,84	
	Kontrol	0,295	0,421	0,4145				
0,5% (25,05µg/ml)	Uji	0,650	0,597	0,6235	0,4685	22,81		
	Kontrol	0,161	0,149	0,155				
0,25% (12,525µg/ml)	Uji	0,651	0,667	0,659	0,541	10,87		
	Kontrol	0,110	0,126	0,118				
0,125% (6,262µg/ml)	Uji	0,671	0,629	0,650	0,562	7,41		
	Kontrol	0,087	0,089	0,088				
B (Blanko)	Uji	0,695		0,607				
	Kontrol	0,089						
Persamaan regresi					y = 1,41 + 0,84 x			

Keterangan : A1 = serapan 1; A2 = serapan 2; S1 = sampel; S0 = kontrol sampel;
 IC50 = konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.11 Aktivitas penghambatan alfa-glukosidase dari fraksi butanol

Konsentrasi		Absorbansi		Absorbansi	S1-S0	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
		A1	A2	Rata-rata			
1 % (50,25µg/ml)	Uji	0,505	0,543	0,524	0,365	39,06	88,51
	Kontrol	0,173	0,145	0,159			
0,5% (25,125µg/ml)	Uji	0,541	0,532	0,536	0,431	28,04	
	Kontrol	0,108	0,102	0,105			
0,25% (12,563µg/ml)	Uji	0,509	0,561	0,535	0,4355	27,29	
	Kontrol	0,110	0,089	0,0995			
0,125% (6,281µg/ml)	Uji	0,527	0,541	0,534	0,4485	25,13	
	Kontrol	0,084	0,087	0,0855			
B (Blanko)	Uji	0,685		0,599			
	Kontrol	0,086					
Persamaan regresi					y = 22,56 + 0,31 x		

Keterangan : A1 = serapan 1; A2 = serapan 2; S1 = sampel; S0 = kontrol sampel;
 IC₅₀ = konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian

Tabel 4.12 Aktivitas penghambatan α -glukosidase dari fraksi air

Konsentrasi		Absorbansi		Absorbansi Rata-rata	S1-S0	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)	
		A1	A2					
1 % (50,4 μ g/ml)	Uji	0,260	0,313	0,2865	0,216	64,64	38,40	
	Kontrol	0,061	0,080	0,0705				
0,5% (25,2 μ g/ml)	Uji	0,536	0,453	0,4945	0,409	33,06		
	Kontrol	0,082	0,089	0,0855				
0,25% (12,6 μ g/ml)	Uji	0,553	0,567	0,560	0,485	20,62		
	Kontrol	0,069	0,081	0,075				
0,125% (6,3 μ g/ml)	Uji	0,616	0,559	0,5875	0,503	17,68		
	Kontrol	0,061	0,108	0,0845				
B (Blanko)	Uji	0,697			0,611			
	Kontrol	0,086						
Persamaan regresi					y = 8,14 + 1,09 x			

Keterangan : A1 = serapan 1; A2 = serapan 2; S1 = sampel; S0 = kontrol sampel;
 IC₅₀ = konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.13 Kinetika penghambatan alfa-glukosidase oleh fraksi petroleum eter

Konsentrasi Substrat [S]	Serapan			1/[S]	1/V ₀	1/V ₁	1/V ₂
	V ₀	V ₁	V ₂				
20	0,509	0,332	0,215	0,200	1,965	3,012	4,651
15	0,576	0,461	0,322	0,100	1,736	2,169	3,106
10	0,548	0,393	0,317	0,067	1,825	2,545	3,155
5	0,577	0,424	0,384	0,050	1,733	2,358	2,604

Keterangan : V₀ = Tanpa inhibitor; V₁ = inhibitor 6,263 µg/ml ; V₂ = inhibitor 12,525 µg/ml

Tabel 4.13 Kinetika penghambatan alfa-glukosidase oleh fraksi petroleum eter (lanjutan)

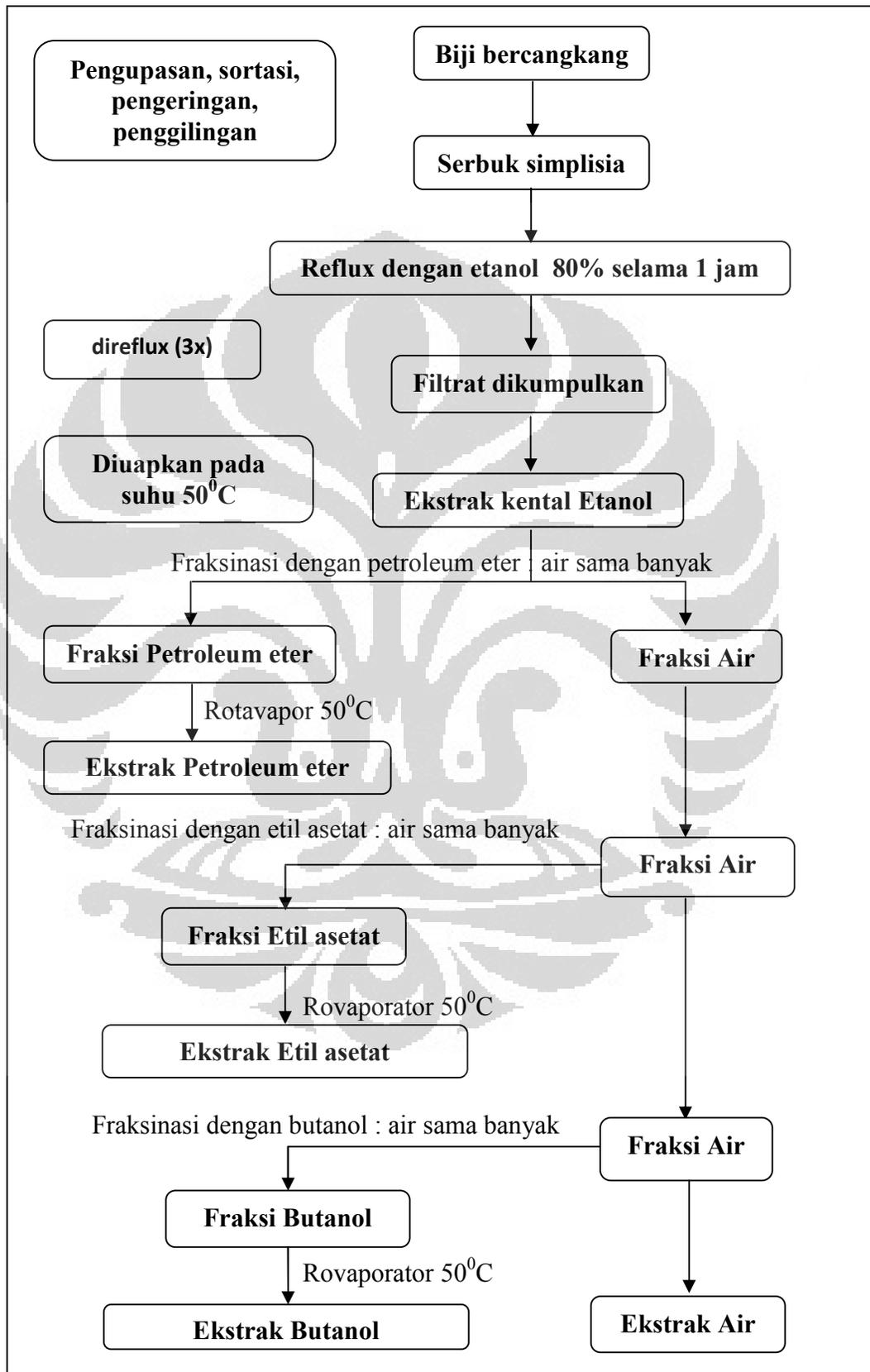
Konsentrasi Substrat [S]	Serapan			1/[S]	1/V ₀	1/V ₃	1/V ₄
	V ₀	V ₃	V ₄				
20	0,509	0,104	0,062	0,200	1,965	9,615	16,129
15	0,576	0,226	0,075	0,100	1,736	4,425	13,333
10	0,548	0,151	0,059	0,067	1,825	6,623	16,949
5	0,577	0,183	0,109	0,050	1,733	5,464	9,174

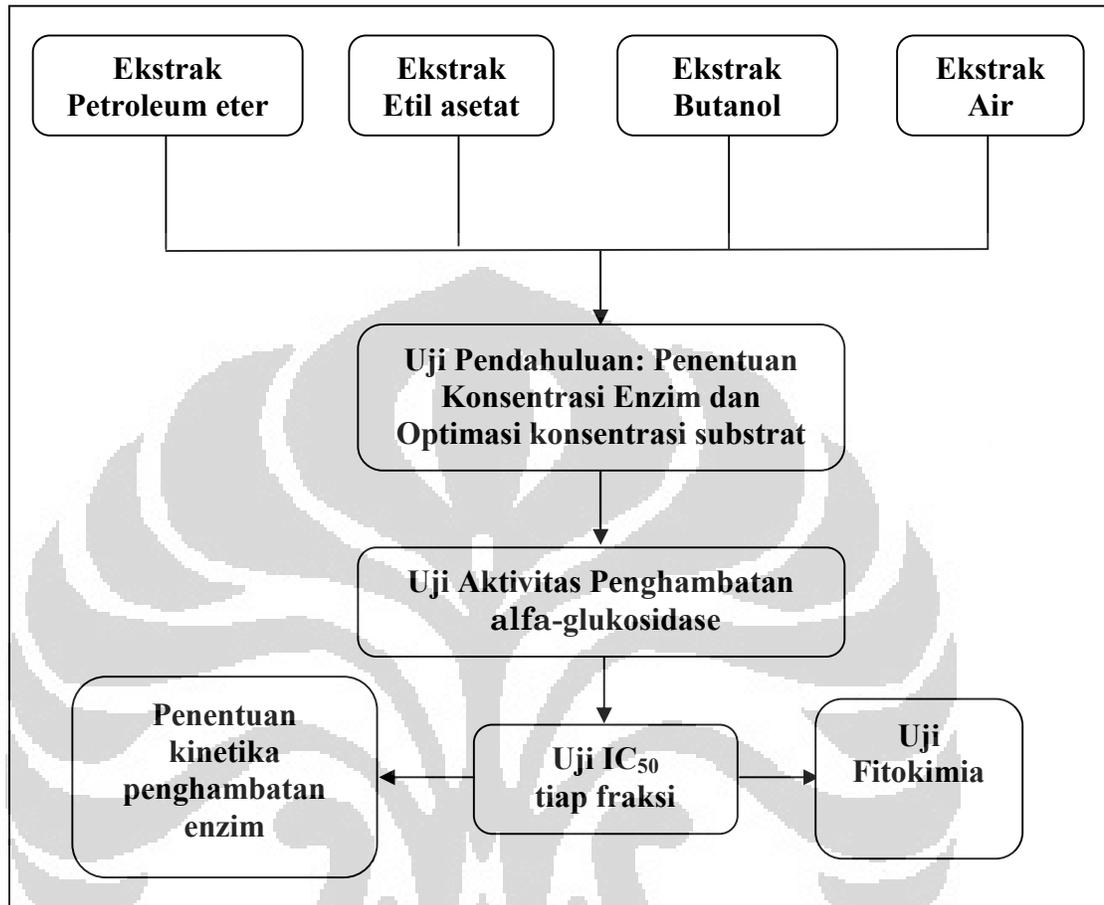
Keterangan : V₀ = Tanpa inhibitor; V₃ = inhibitor 25,05 µg/ml ; V₄ = inhibitor 50,1 µg/ml

Tabel 4.14 Hasil identifikasi kandungan kimia tiap fraksi

Kandungan Kimia	Pereaksi	Fraksi Petroleum eter	Fraksi Etil aasetat	Fraksi Butanol	Fraksi Air
Alkaloid	Mayer LP	-	-	-	+
	Bouchardat LP	-	-	+	+
	Dragendorff LP	-	-	-	-
Glikosida	Reaksi Mollish	-	+	+	+
Flavonoid	Serbuk Zn + HCl 2N + HCl (P)	-	-	-	-
	Serbuk Mg + HCl (P)	-	-	-	-
	Aseton + serbuk asam borat + serbuk asam oksalat	-	-	-	-
Terpen	Asam aasetat anhidrat + asam sulfat (P)	+	+	+	-
Tanin	FeCl ₃ 1%	-	-	-	-
	Gelatin 10%	-	-	-	-
	NaCl-Gelatin	-	-	-	-
Saponin	Air panas	-	-	-	-
Kuinon	Benzen + NaOH 2N	-	-	-	-

Lampiran 1. Bagan tahapan kerja



Lampiran 1. Bagan tahapan kerja (lanjutan)

Lampiran 2. Cara perhitungan unit larutan Alfa-glukosidase

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

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

Perbandingan jumlah protein dengan total massa serbuk

$$\frac{4,29 \text{ mg protein}}{16,5 \text{ mg serbuk}} = \frac{1 \text{ mg protein}}{3,85 \text{ mg serbuk}} \rightarrow 1 \text{ mg protein} \approx 3,85 \text{ mg serbuk} \approx 179 \text{ unit}$$

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

Jadi, dalam 1 kemasan enzim Alfa-glukosidase mengandung 767,14 unit.

Penimbangan enzim α -glukosidase untuk pengujian

$$0,03 \text{ U/ml} \times 100 \text{ ml} = 3 \text{ Unit}$$

$$\frac{3 \text{ Unit}}{179 \text{ U/mg protein}} = 0,01675 \text{ mg protein}$$

$$\frac{0,01675 \text{ mg protein}}{4,29 \text{ mg protein}} \times 16,5 \text{ mg solid} = 0,064 \text{ mg solid}$$

karena penimbangan yang didapat 1,2 mg, maka :

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

$$0,312 \text{ mg protein} \times 179 \text{ U/mg} = 55,848 \text{ Unit}$$

$$\text{Larutan induk} = \frac{55,848 \text{ U}}{100 \text{ ml}} = 0,55848 \text{ U/ml}$$

$$\text{pengenceran 1} = 5/10 \times 0,55848 \text{ U/ml} = 0,2792 \text{ U/ml}$$

$$\text{pengenceran 2} = 1/10 \times 0,27927 \text{ U/ml} = 0,027924 \text{ U/ml}$$

Lampiran 3. Hasil identifikasi tanaman



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT KONSERVASI TUMBUHAN - KEBUN RAYA BOGOR
(Center for Plant Conservation - Bogor Botanical Gardens)
 Jalan Ir. H. Juanda No. 13, P.O. Box 309 Bogor 16003, Indonesia
 Telepon (0251) 322187, 321657, 322220, 311362, 352519, Fax. 62 (251) 322187, 313985
 e-mail : knibli@bogor.wasantara.net.id ; inetpc@indo.net.id

Bogor, 3 November 2011

<p>No. : 227/IPH.3.02/KS/XI/2011</p> <p>Lampiran :-</p> <p>Hal : Keterangan determinasi</p>	<p>Kepada Yth.:</p> <p>Sdr. Ayuti Haqqi A NPM: 0906601336 Departemen Farmasi Universitas Indonesia Kampus UI Depok 16424 Fax. 021 7863433</p>
---	--

Dengan hormat,

Sehubungan dengan surat Sekretaris Departemen Farmasi Universitas Indonesia No. 1310/H2.F3.12/PDP.04.01/2011, dengan ini kami menerangkan bahwa material yang Saudari minta adalah *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae).

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.



B. D. KEPALA
 Kepala Bidang Konservasi Ex-situ
 Dr. Joko Ridho Witono
 NIP. 197010091994031004

Lampiran 4. Sertifikat analisis alfa-Glukosidase

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	α-Glucosidase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , recombinant, expressed in unspecified host, lyophilized powder, ≥125 units/mg protein	
Product Number	G0660	
Product Brand	SIGMA	
CAS Number	9001-42-7	

TEST	SPECIFICATION	LOT 129K1425 RESULTS
% Protein (Biuret)	≥10	26
units/mg protein	≥125	179
	One unit will liberate 1.0 micromole of D-Glucose from P-Nitrophenyl Alpha-D-Glucoside per minute at pH 6.8 at 37 deg C.	
units/mg protein	≥50	114
	One unit will convert 1.0 micromole of Maltose to 2.0 micromoles of D-Glucose per minute at pH 6.0 at 25 deg C.	
Recommended Retest Period	4 years	
Specification Date:	APR 2009	
Date of QC Release:	JAN 2010	
Recommended Retest Date:	DEC 2013	
Print Date:	JAN 25 2010	

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