



UNIVERSITAS INDONESIA

**Uji Efek Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Fraksi dari Ekstrak
Etil Asetat Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale* Linn.) dan
Penapisan Fitokimia dari Fraksi Teraktif**

SKRIPSI

**INDAH NUR FITRIANDINY
0806453610**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**Uji Efek Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Fraksi dari Ekstrak
Etil Asetat Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale* Linn.) dan
Penapisan Fitokimia dari Fraksi Teraktif**

SKRIPSI

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

**INDAH NUR FITRIANDINY
0806453610**

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

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

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

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

Depok

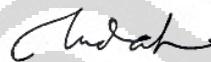

Indah Nur Fitriandiny

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Indah Nur Fitriandiny

NPM : 0806453610

Tanda Tangan : 

Tanggal : 2 Juli 2012

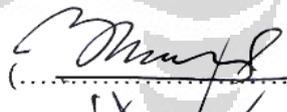
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Indah Nur Fitriandiny
NPM : 0806453610
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Uji Efek Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase
Fraksi dari Ekstrak Etil Asetat Daun Jambu Mete
(*Anacardium occidentale* Linn.) dan Penapisan
Fitokimia dari Fraksi Teraktif.

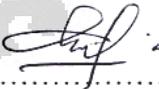
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

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

Pembimbing II : Dr. Herman Suryadi M.S., Apt. (..........)

Penguji I : Drs. Hayun, M.Si. (..........)

Penguji II : Dr. Bema Elya, Apt., M.Si. (..........)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 2 Juli 2012

KATA PENGANTAR

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

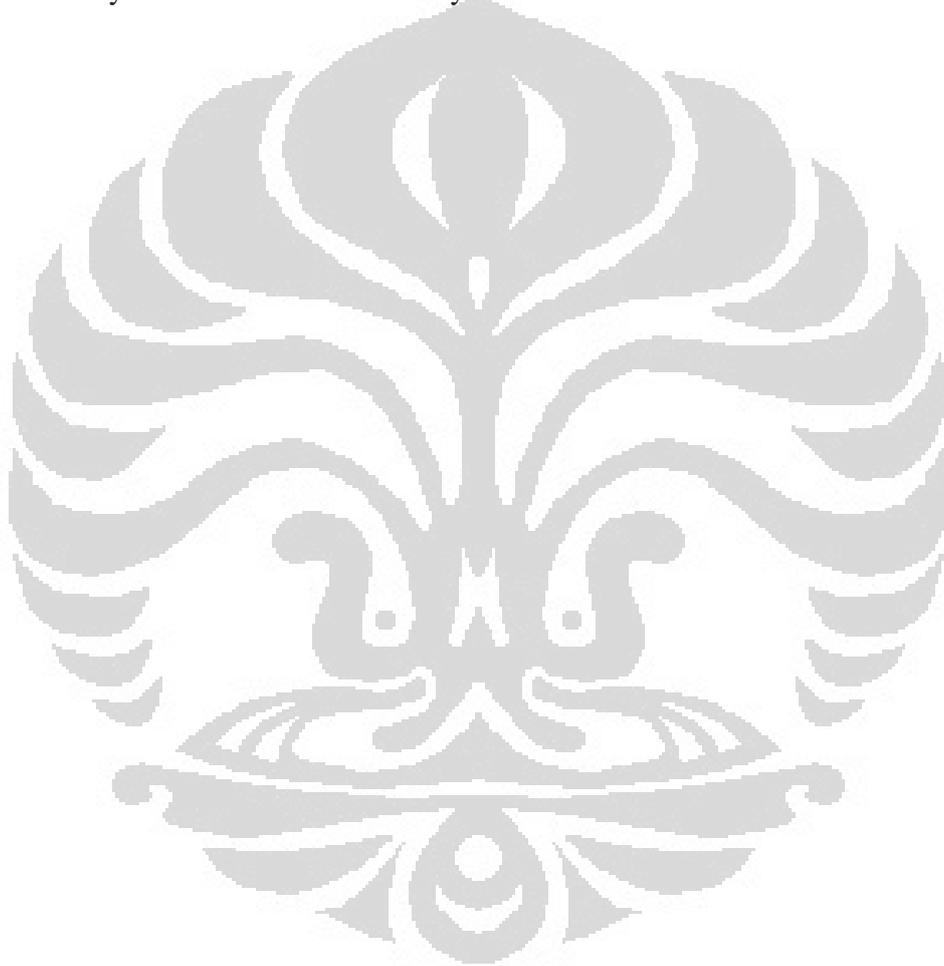
Selama penelitian dan penulisan, banyak sekali pihak di yang telah membantu penulis sejak awal perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini diselesaikan. Untuk itu, penulis hendak mengucapkan terima kasih kepada :

- 1) Bapak Dr. Abdul Mun'im, M.S., selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi;
- 2) Bapak Dr. Herman Suryadi M.S., Apt., selaku dosen pembimbing skripsi dan pembimbing akademik yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini;
- 3) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, Apt. selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
- 4) Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;
- 5) Ibunda Nuraini, Ayahanda Teguh Purwahandaka, Mas Hadi dan Sarah yang tak henti mendoakan, memberi semangat, dukungan dan motivasi, serta selalu menjadi inspirasi bagi penulis untuk selalu belajar dengan baik;
- 6) Sahabat dan rekan kerja penulis yang telah banyak member bantuan, dukungan, semangat dan doa, juga keluarga besar Farmasi angkatan 2008 yang senantiasa berbagi masa suka dan duka bersama selama masa perkuliahan dan penelitian;
- 7) Segenap staf pegawai Departemen Farmasi FMIPA UI yang senantiasa membantu penulis selama menjalani penelitian dan penyusunan skripsi ini;

8) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis sadar tidak mampu memberikan sesuatu yang lebih berharga selain ucapan terima kasih dan berdoa semoga Alla SWT yang akan membalas segala kebaikan mereka dengan sesuatu yang lebih baik lagi.

Besar harapan penulis semoga penulisan skripsi ini dapat berguna bagi ilmu pengetahuan khususnya bagi pengembangan ilmu kefarmasian sehingga manfaatnya bisa sirasakan oleh masyarakat luas.



Penulis

2012

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

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

Nama : Indah Nur Fitriandiny
NPM : 0806453610
Program Studi : S1 Farmasi Reguler
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

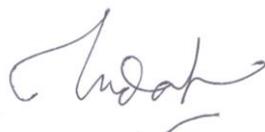
demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Uji Efek Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Fraksi dari Ekstrak Etil Asetat Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale* Linn.) dan Penapisan Fitokimia dari Fraksi Teraktif

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 2 Juli 2012
Yang menyatakan



(Indah Nur Fitriandiny)

ABSTRAK

Nama : Indah Nur F.
Program Studi : S1 Farmasi
Judul : Uji Efek Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Fraksi dari Ekstrak Etil Asetat Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale* Linn.) dan Penapisan Fitokimia dari Fraksi Teraktif.

Diabetes melitus adalah salah satu penyakit dari sepuluh besar penyakit di Indonesia dengan prevalensi yang terus meningkat secara signifikan. Berkaitan dengan salah satu target pengobatannya yaitu menurunkan kadar gula darah, obat golongan penghambat α -Glukosidase dapat menghambat pemecahan karbohidrat di usus halus, menurunkan kondisi hiperglikemia postprandial dan lonjakan sekresi insulin. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol 80% daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L) memiliki efek penghambatan aktivitas α -glukosidase yang baik dengan nilai IC_{50} 9,11 ppm. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh fraksi yang memiliki penghambatan aktivitas α -glukosidase tertinggi dari ekstrak etil asetat daun jambu mete dan mengetahui golongan senyawa kimia dari fraksi teraktif tersebut. Daun jambu mete direfluks dengan heksana, etil asetat, dan metanol kemudian difraksinasi dengan kromatografi kolom. Pengujian efek penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase dilakukan berdasarkan penghambatan konversi p-Nitrofenil- α -D-glukopiranosida sebagai substrat menjadi p-nitrofenol dan α -D-glukosa. Absorbansi p-nitrofenol diukur pada panjang gelombang 405 nm. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun jambu mete memiliki penghambatan paling kuat terhadap aktivitas α -glukosidase dengan nilai IC_{50} 43,66 ppm dengan fraksi paling kuat yaitu fraksi F dengan nilai IC_{50} 28,76 ppm. Uji kinetika enzim menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun jambu mete mempunyai aktivitas penghambatan non-kompetitif. Golongan senyawa kimia yang terdapat pada fraksi F etil asetat daun jambu mete adalah glikosida, flavonoid, antrakuinon, tanin, dan saponin.

Kata Kunci : diabetes melitus, penghambat α -glukosidase, daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.), fraksi aktif.
xiii + 91 halaman : 18 gambar; 18 tabel; 3 lampiran
Daftar Acuan : 56 (1984-2012)

ABSTRACT

Name : Indah Nur F.
Program study: S1 Pharmacy
Title : α -Glucosidase inhibiting activity of ethyl acetat extract from cashewnut leaves (*Anacardium occidentale* L.) and phytochmeical screening from the active fraction.

Diabetes mellitus is a one of the top ten diseases in Indonesia with a significantly increased prevalence. Among glucose-lowering medications, α -glucosidase inhibitors delay the absorption of ingested carbohydrates, reducing the postprandial glucose and insulin peaks. In previous study, 80% ethanol extract of cashewnut (*Anacardium occidentale* L.) leaves showed a good α -Glucosidase inhibiting activity with IC_{50} value 9.11 ppm. The purpose of this study is to know the α -glukosidase inhibiting activity from cashewnut leaves extract and it's fraction. Cashewnut leaves were refluxed using hexane, etil asetat and methanol then fractionated using column chromatography. The inhibiting activity of α -glucosidase was tested based on inhibition of conversion of p-Nitrofenil- α -D-glukopiranosida as a substrate to p-nitrophenol and α -D-glucose. Absorbance of p-nitrophenol was measured at a wavelength of 405 nm. The result showed that the ethyl acetat extract of cashewnut leaves has the highest α -glucosidase inhibiting activity than other extract with IC_{50} values 43.66 ppm with fraction F from column chromatograph as the most active fraction with IC_{50} value 28.76 ppm. The kinetic assay of this inhibiting activity showed that ethyl acetat extract of cashewnut leves is a noncompetitive inhibiting activity. Phytochemical screening result shows that Fraction F from ethyl acetat extract of cashewnut leaves contained glycosides, flavonoids, tannins, anthraquinone and saponin.

Key words :diabetes mellitus, α -glucosidase inhibitor, cashewnut, *Anacardium occidentale* L. leaves, phytochemical screening.
xiii + 91 pages : 18 pictures; 18 tables; 3 appendices
Bibliography : 56 (1984-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1.Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Jambu mete (<i>Anacardium occidentale L.</i>)	3
2.2 Diabetes Mellitus	7
2.3 Enzim	13
2.4 Enzim α -Glukosidase.....	16
2.5 TeknikPemisahan.....	23
2.6 Spektroskopi	29
2.7 Penapisan Fitokimia	32
3. METODE PENELITIAN	36
3.1 Lokasi Dan Waktu Penelitian.....	36
3.2 Bahan	36
3.3 Alat.....	37
3.4 Prosedur Pelaksanaan	37
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	54
4.1 Ekstraksi Simplisia	54
4.2 Fraksinasi.....	55
4.3 Uji Pendahuluan Enzim	57
4.4 Uji Efek Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase	60
4.5 Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase	64
4.6 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia	66
5. KESIMPULAN DAN SARAN	70
4.3 Kesimpulan	70
4.4 Saran	70
DAFTAR ACUAN	71

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Daun Jambu Mete (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	3
2.2 Struktur Kandungan Kimia Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete	6
2.3 Struktur Kimia Akarbose	17
2.4 Reaksi Enzimatis α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D glukopiranosida	18
2.5 Plot Resiprokal-Ganda atau Lineweaver-Burk $1/v_i$ versus $1/[S]$	20
2.6 Plot Lineweaver-Burk dari Inhibisi Kompetitif	21
2.7 Plot Lineweaver-Burk untuk Inhibisi Non Kompetitif	22
2.8 Variasi Jalur Sampel dalam Sumuran <i>Microplate</i> (A) dan Jalur Sampel pada Kuvet (B)	31
2.9 Hasil Jalur Sampel dengan Perbedaan Volume Sampel pada Sumuran <i>Microplate</i>	31
3.1 Skema Prosedur Pelaksanaan	37
3.2 Skema Ekstraksi	76
3.3 Skema Fraksinasi	77
4.1 Grafik Hasil Uji Pendahuluan Variasi Konsentrasi Substrat	58
4.2 Grafik Hasil Uji Pendahuluan Variasi Waktu Inkubasi	60
4.3 Plot Lineweaver-Burk Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase pada Fraksi F Ekstrak Etil Asetat Daun Jambu Mete 20 $\mu\text{g/mL}$	65
4.4 Identifikasi senyawa golongan tannin	78
4.5 Identifikasi senyawa golongan flavonoid	78
4.6 Identifikasi senyawa golongan antrakuinon	79
4.7 Identifikasi senyawa golongan saponin	79
4.8 Identifikasi senyawa golongan glikosida	80
4.9 Microplate Reader Biotek ELX 808	80

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Kondisi Berdasarkan Kadar Glukosa Darah	10
2.2 Zat Penyerap untuk Kromatografi Lapisan Tipis	28
3.1 Skema penambahan reagen uji pendahuluan enzim α -glukosidase	44
3.2 Skema penambahan reagen uji penghambatan α -glukosidase	47
3.3 Prosedur Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim	50
4.1 Rendemen Ekstrak	81
4.2 Bobot Fraksi Hasil Kromatografi Kolom	81
4.3 Uji Pendahuluan Aktivitas Variasi Waktu Inkubasi	81
4.4 Uji Pendahuluan Enzim dengan Variasi Konsentrasi Substrat	82
4.5 Hasil Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase	62
4.6 Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase pada Akarbose	83
4.7 Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase pada Ekstrak Heksana	84
4.8 Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase pada Ekstrak Etil Asetat	85
4.9 Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase pada Ekstrak Metanol	86
4.10 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Fraksi dari Ekstrak Etil Asetat	63
4.11 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Fraksi dari Ekstrak Etil Asetat Fraksi F	87
4.12 Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Enzim Fraksi F Ekstrak Etil Asetat 20 μ g/mL	88
4.13 Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten Fraksi F Etil Asetat 20 μ g/mL	88

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Identifikasi Tanaman	89
2. Sertifikat Analisis Enzim α -Glukosidase	90
3. Lampiran 3. Sertifikat Analisis Enzim Sustrat 4-Nitrofenil- α -D-Glukopiranosida (PNPG)	91



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus merupakan salah satu penyakit di dalam sepuluh besar penyakit di Indonesia. Prevalensi penyakit ini di dunia terus meningkat setiap tahunnya dengan angka 2,8% di tahun 2000 dan diperkirakan akan meningkat hingga 4,4% ditahun 2030 (Wild, 2004). Diabetes Melitus (DM) adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia dan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin, penurunan sensitivitas insulin atau keduanya (Dipiro et al., 2005).

Pengobatan diabetes secara farmakologis dapat dilakukan dengan pemberian obat golongan penghambat α -glukosidase yang dapat menunda penguraian sukrosa dan karbohidrat kompleks di usus halus. Efek utama yang timbul akibat aksi ini ialah dapat mengurangi peningkatan kadar glukosa darah setelah makan (Dipiro, et al, 2005).

Pada pasien diabetes, terdapat banyak obat-obatan herbal yang dapat menurunkan kadar glukosa dalam darah dan dapat membantu mengontrol kondisi hiperglikemia yang lebih ringan pada diabetes tidak tergantung insulin. Beberapa tanaman tersebut memiliki aktivitas menurunkan kadar gula darah dengan mekanisme yang berbeda. Salah satunya melalui mekanisme penghambatan absorpsi glukosa di usus sehingga mencegah terjadinya lonjakan kadar glukosa dalam darah yang biasanya terjadi setelah makan (Heinrich et al., 2004).

Berdasarkan penelitian terdahulu terbukti bahwa ekstrak etanol 80% dari daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) memiliki aktivitas penghambat α -glukosidase lebih baik dari akarbose (Masitha, 2011). Efek antidiabetes juga dimiliki oleh ekstrak alkohol dari daun jambu mete yang ditunjukkan pada uji pada tikus yang diinduksi diabetes dengan streptozotocin dengan penurunan kadar glukosa darah yang signifikan (Kamtchouing et al, 1998).

Salah satu kandungan pada ekstrak metanol-air daun jambu mete adalah flavonoid (de Brito, et al., 2007), yang memiliki efek hipoglikemik melalui mekanisme penghambatan aktivitas α -glukosidase (Pereira, et al., 2011).

Berdasarkan polaritas substrat enzim yang akan diinhibisi, hendaknya penghambat yang akan diekstrak dari simplisia daun jambu mete memiliki sifat semipolar hingga polar. Sehingga untuk mendapatkan aktivitas yang baik hendaknya dipilih pelarut yang memiliki polaritas yang serupa salah satunya adalah etil asetat. Maka pada penelitian ini dilakukan uji penghambatan aktivitas α -glukosidase dari ekstrak etil asetat daun jambu mete sebagai obat antidiabetes.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh fraksi yang memiliki efek penghambatan aktivitas α -glukosidase tertinggi dari ekstrak etil asetat daun tanaman jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dan mengetahui golongan senyawa kimia dari fraksi teraktif tersebut.

1.3 Manfaat

Penelitian ini memiliki manfaat sebagai dasar bagi penelitian selanjutnya dalam mengisolasi senyawa penghambat enzim α -glukosidase yang akan menjadi alternatif pengobatan penyakit diabetes mellitus dan isolate yang diperoleh dapat digunakan sebagai penanda kualitas simplisia daun jambu mete.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun Jambu mete (*Anacardium occidentale* L.)

Daun jambu mete merupakan tanaman yang umum digunakan oleh masyarakat di Indonesia sebagai pengobatan tradisional berbagai macam penyakit salah satunya adalah diabetes mellitus.



[sumber : dokumentasi pribadi]

Gambar 2.1 Daun jambu mete

2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi botani tanaman jambu mete adalah sebagai berikut:

- Kerajaan : Plantae
- Divisi : Magnoliophyta
- Kelas : Magnoliopsida
- Bangsa : Sapindales
- Suku : Anacardiaceae
- Marga : Anacardium
- Jenis : *Anacardium occidentale* L.

2.1.2 Sinonim dan Nama Daerah (Kasahara & Hemmi, 1986)

Sinonim : *Acajuba occidentalis* (L.) Gaertn; *Cassuvium pomiferum* Lam.

Nama daerah : Jambu monyet, jambu mente (Jawa tengah) ; jambu mede (Sunda); kanoke (Maluku); yao kuo (China); cashew (Inggris); kasoy (Filipina); kashu nattsu (Jepang); yaruang (Thailand); acagia (Italia)

2.1.3 Morfologi (Depkes RI, 1989).

Tanaman jambu mete berupa pohon berukuran sedang, tinggi sampai dengan 12 m, sangat bercabang-cabang dan selalu hijau. Tanaman ini bias memiliki ukuran tinggi dan menyempit atau rendah melebar bergantung pada kondisi lingkungannya. Akar tanaman ini kuat, berbentuk tunggang dengan kedalaman lebih dari 3 m. Bentuk batang tanaman jambu mete tidak rata, agak bengkok dan mengandung getah. Potongan kulit kayu pada pohon ini melengkung atau menggulung membujur pada kedua sisi.

Helaian daun jambu mete berjenis tunggal, dan memiliki tangkai. Warna daun nya hijau kekuningan sampai hijau tua kecokelatan dengan panjang 4-22 cm, lebar 2-15 cm. Ujung daun jambu mete membulat seperti pada ujung yang tumpul dengan lekukan kecil di tengah dengan bagian pangkal yang meruncing runcing. Pinggir daun jambu mete berbentuk rata dengan panjang tangkai sampai 3 cm. Tulang daun tanaman ini berbentuk menyirip. Daun jambu mete memiliki permukaan daun yang licin pada bagian atas dan bawah daun dan tidak memiki rambut.

Bunga dari tanaman jambu mete keluar pada setiap ujung cabang berupa malai atau kadang berupa malai rata dengan panjang mencapai 26cm. Daun pelindung berbentuk bundar telur sampai lonjong. Helaian kelopak bunga tanaman jambu mete berbentuk bundar telur sampai lanset dengan panjang 3mm–5mm. Helaian mahkota bunga berbentuk pita yang awalnya berwarna coklat susu kekuningan dengan garis-garis merah kemudian menjadi merah dengan panjang 7-15 mm. Panjang benang sari dari bunga

Universitas Indonesia

tanaman ini adalah sekitar 2-12 mm dengan kepala sari yang panjangnya 0,75-1 mm.

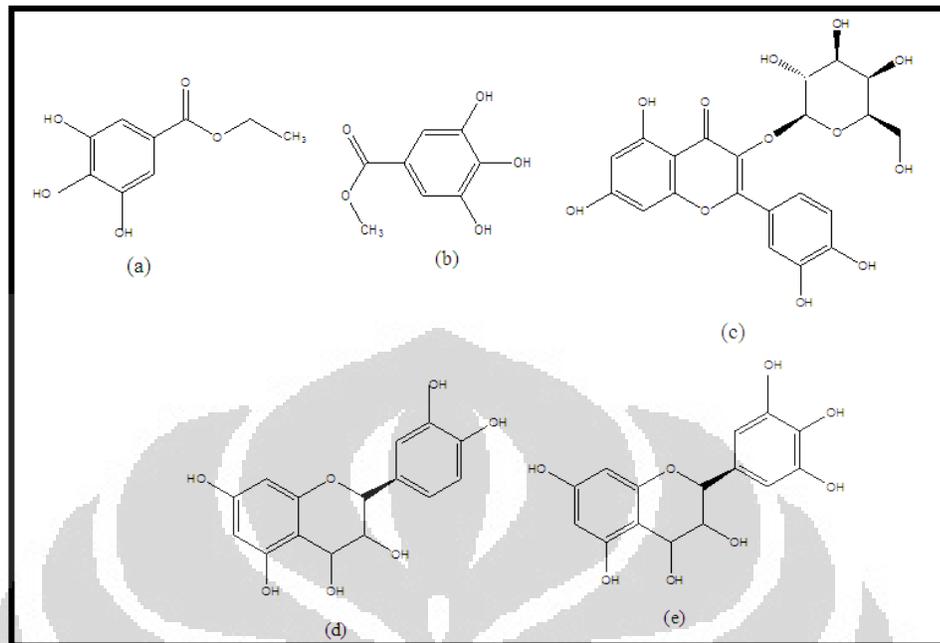
Buah jambu mete berbentuk tebal dengan biji lonjong dan sebuah benih coklat kemerahan dengan dua kotoledon besar dibagian bawah. Biji pada buah berbentuk ginjal dengan kulit biji berwarna coklat kemerahan. Buah jambu mete memiliki dua keping biji yang besar dengan embrio kecil.

2.1.4 Ekologi dan Persebaran (Depkes RI, 1989)

Tanaman ini berasal dari Amerika tropik. Tersebar di Meksiko sampai Peru, Brasilia dan India hingga Mozambik di Afrika Timur. Dari India meluas ke daerah Asia lainnya dan Indonesia. Tanaman ini dapat tumbuh pada berbagai jenis tanah dan iklim kering, kecuali tanah liat berat, tanah yang mengandung lapisan garam dan tanah dengan system pengairan yang buruk. Jambu mete tumbuh pada ketinggian 1-1200 m diatas permukaan laut. Tanaman ini dapat tumbuh dengan produksi buah yang baik pada tanah yang kering bahkan tanpa pemupukan. Dapat tumbuh dan berproduksi di tempat kering dengan curah hujan 500 mm setahun. Di tempat dengan curah hujan tinggi tanaman ini juga masih dapat tumbuh asalkan sistem pengairannya baik.

2.1.5 Kandungan Kimia

Kandungan kimia dari ekstrak kental daun jambu mete adalah etil galat, hiperosida metilgalat, flavonoid leukosianidin dan leukodelfinidin. Dan senyawa identitasnya adalah leukosianidin (BPOM RI, 2004)



[Sumber :Kusmardiyani & Nawawi, 1992]

Gambar 2.2 Struktur kandungan kimia ekstrak etanol daun jambu mete.

Ket: (a) Etil Galat, (b) Metil Galat, (c) Hiperosida, (d) Leukosianidin, (e) Leukodelphinidin

2.1.6 Kegunaan Tradisional

Tanaman jambu mete banyak ditanam untuk diambil bijinya, baik untuk dikonsumsi maupun dijadikan minyak yang bernilai komersial. Bijinya memiliki kandungan nutrisi yang cukup baik seperti lemak, protein, karbohidrat, vitamin, dan mineral. Minyaknya berasal dari sel kulit biji nya yang digunakan sebagai obat untuk keracunan makanan (Kasahara & Hemmi, 1986) dan oleh industri juga digunakan sebagai pengawet, resin sintetik, produk berlapis dan sebagainya. Selain bijinya, buahnya juga dapat dikonsumsi baik dimakan segar maupun sebagai campuran salad atau dijadikan minuman.

Daun jambu mete digunakan secara tradisional untuk pengobatan luka bakar, radang amandel dan disentri. Getah pada buah yang masih muda digunakan sebagai obat penyakit lepra, luka menahun, dan radang pada rahim (Kasahara & Hemmi, 1986).

2.1.7 Aktivitas Biologis

Minyak biji jambu mete memiliki aktivitas biologis yang luas. Ekstrak etanol dari tanaman ini memiliki aktivitas antifungi dengan spektrum luas dan persentase yang lebih tinggi dibanding dengan ekstrak aseton dan etil asetat (Kannan et al., 2009).

Berdasarkan penelitian, ekstrak daun jambu mete (*A. occidentale* L.) dikombinasikan dengan ekstrak *Psidium guajava* dapat menghambat pertumbuhan rotavirus pada monyet (Ahmad, Aqil, & Owais, 2006).

Selain itu sari alkohol daun muda jambu mete memberikan efek analgetik terhadap nyeri yang ditimbulkan oleh asam asetat pada mencit putih (Nuraini, 1992; Septiana, 1996; & Suhaeti, 1996). Daun jambu mete juga terbukti memiliki aktivitas antimikroba pada uji terhadap bakteri gram positif yaitu *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Havizah, 1996).

Efek antiulcerogenik dari ekstrak hidroetanol daun jambu mete juga terbukti efektif. Dengan adanya aktivitas inhibisi lesi gastrik yang diinduksi oleh HCl/etanol pada tikus betina (Konan & Bacchi, 2007).

2.2 Diabetes Mellitus

2.2.1 Definisi

Diabetes Mellitus adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia dan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin, penurunan sensitivitas insulin atau keduanya (Dipiro, et al., 2005).

2.2.2 Klasifikasi

2.2.2.1 Diabetes Mellitus tipe 1

Diabetes Mellitus tipe 1 disebut juga *insulin-dependent diabetes melitus* (IDDM). Pada diabetes tipe ini sekresi insulin oleh pankreas sangat sedikit atau bahkan tidak ada sama sekali. Kondisi ini diakibatkan oleh adanya

Universitas Indonesia

destruksi otoimun sel-sel β pulau Langerhans sehingga terjadi defisiensi insulin absolute. Pasien dengan diabetes tipe 1 biasanya bertubuh kurus yang merupakan efek dari defisiensi insulin serta ketidakmampuan sel untuk menggunakan dan menyimpan kalori karbohidrat (Linn, et al., 2009). Walaupun Gejala dari diabetes tipe ini sering muncul pada masa kanak-kanak atau remaja, namun timbulnya gejala pada usia dewasa masih mungkin terjadi.

2.2.2.2 Diabetes Melitus tipe 2

Diabetes Melitus tipe 2 disebut juga sebagai noninsulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). Diabetes tipe ini terjadi karena resistensi jaringan yang signifikan terhadap insulin yang dibarengi oleh respon sekresi insulin yang tidak cukup untuk mengatasi resistensi tersebut (Linn, et al., 2009).

Karakteristik dari diabetes tipe ini adalah resistensi insulin serta sekresi insulin yang rendah dan semakin lama cenderung menurun. Individu dengan diabetes tipe 2 cenderung menunjukkan menunjukkan kondisi obesitas, yang merupakan akibat dari diabetes tipe 2 itu sendiri. Selain itu, hipertensi, dislipidemia (kadar trigliserida tinggi dan kadar HDL-kolesterol rendah) serta kadar inhibitor pengaktivasi plasminogen tipe 1 (PAI-1) yang meningkat juga sering terlihat pada individu tersebut (Linn, et al., 2009). Pengobatan penyakit ini adalah dengan pemberian obat antidiabetes (Suherman, 2007).

2.2.2.3 Diabetes Melitus Gestational

Diabetes Melitus Gestasional (GDM) adalah kondisi intoleran terhadap glukosa pada wanita hamil yang sebelumnya tidak mengidap diabetes. Komplikasi ini terjadi sekitar 7% dari total kehamilan dan sekitar 50% wanita pengidap kelainan ini akan kembali ke status nondiabetes setelah kehamilan berakhir (Dipiro, et al., 2005).

Penyebab diabetes gestational dianggap berkaitan dnengan peningkatan kebutuhan energi dan kadar estrogen serta hormon pertumbuhan

yang terus tinggi selama kehamilan. Hormone pertumbuhan dan estrogen menstimulasi pelepasan insulin yang berlebihan yang menyebabkan penurunan responsivitas seluler (Corwin, 2001).

Diabetes gestasional dapat menimbulkan efek negatif pada kehamilan dengan meningkatkan risiko malformasi kongenital, lahir mati, dan bayi bertubuh besar, yang dapat menimbulkan masalah pada persalinan.

2.2.2.4 Diabetes Tipe Lain

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

2.2.3 Terapi Diabetes Melitus

2.2.3.1 Target Terapi

Target terapi diabetes melitus adalah secara konsisten menormalkan kadar glukosa darah dengan variasi minimum. Penelitian-penelitian terakhir mengisyaratkan bahwa upaya mempertahankan kadar glukosa darah senormal dan sesering mungkin dapat mengurangi angka kesakitan dan kematian. Selain itu, terapi diabetes melitus juga bertujuan untuk mengurangi komplikasi jangka panjang mikrovaskular dan makrovaskular, mencegah komplikasi akut akibat kadar glukosa darah tinggi, meminimalkan kejadian hipoglikemik dan menjaga keseluruhan kualitas hidup pasien (Chisholm-Burns, *et al.*, 2008).

Tabel 2.1 Kondisi berdasarkan kadar glukosa darah

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

[Sumber : Chisholm-Burns, *et al.*,2008]

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

2.2.3.2 Terapi Nonfarmakologi

Penderita diabetes diharapkan dapat mengontrol kadar gula secara teratur dan mempertahankan berat badan yang normal. Hal ini dikarenakan pada penderita diabetes yang bertubuh gemuk, kadar gula darah sulit dikendalikan. Penurunan berat badan dapat mengurangi resistensi insulin dan memperbaiki respon sel-sel β terhadap stimulus glukosa. Adapun kunci sukses untuk mendapatkan berat badan dan kadar gula yang normal adalah:

a. Diet

Diet yang dianjurkan adalah makanan dengan komposisi yang seimbang sesuai kebutuhan gizi. Rencana diet diabetes dihitung secara individual bergantung pada kebutuhan pertumbuhan, rencana penurunan berat, dan tingkat aktivitas. Sebagian pasien diabetes tipe II mengalami pemulihan kadar glukosa darah mendekati normal hanya dengan intervensi diet karena adanya peran faktor kegemukan.

Pembagian kalori pada pasien terdiri biasanya 50-60% dari karbohidrat kompleks, 20% dari protein dan 30% dari lemak. Diet juga mencakup serat, vitamin, dan mineral (Corwin, 2001).

b. Olah Raga

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

c. Berhenti Merokok

Berhenti merokok merupakan salah satu terapi nonfarmakologi untuk penderita diabetes melitus. Nikotin yang terdapat pada rokok dapat mempengaruhi secara buruk penyerapan glukosa oleh sel. Merokok juga menghasilkan banyak radikal bebas. Banyak indikasi menunjukkan bahwa pada penderita diabetes, metabolisme glukosa yang terganggu menimbulkan kelebihan radikal bebas, yang memegang peranan penting pada terjadinya komplikasi lambat (Tjay & Kirana, 2008).

2.2.3.3 Terapi Farmakologi

Terapi farmakologi untuk penyakit diabetes melitus meliputi insulin, sulfonilurea, meglitinida, agen penghambat α -glukosidase, tiazolindindion (TZD), biguanida, golongan peptida serupa glukagon, dan penghambat aktivitas Dipeptidyl Peptidase-4 (Linn, et al., 2009).

Antidiabetik oral diindikasikan bagi pasien diabetes tipe II jika diet dan olahraga tidak cukup menurunkan kadar gula darah yang tinggi.

a. Insulin

Sediaan insulin umumnya diperoleh dari sapi atau babi. Dengan berbagai teknik isolasi dan modifikasi diperoleh bermacam-macam sediaan dengan sifat yang berbeda berdasarkan mula kerja dan masa kerjanya, diantaranya sediaan insulin mula kerja cepat (*short-acting insulin*), insulin masa kerja sedang (*intermediate-duration insulin*), insulin mula kerja cepat dengan masa kerja singkat dan masa kerja panjang (*long-duration insulin*)

(Chisholm-Burn, *et al.*, 2008). Mekanisme kerja insulin adalah menurunkan kadar gula darah dengan menstimulasi pengambilan glukosa perifer dan menghambat produksi glukosa hepatic.

b. Sulfonilurea

Golongan sulfonilurea menstimulasi sekresi insulin dari sel- β pancreas dengan berikatan dengan reseptor sulfonilurea pada permukaan sel- β . Antidiabetes golongan ini terbagi menjadi generasi pertama dan generasi kedua. Generasi pertama memiliki durasi aksi yang lebih singkat (kurang dari 12 jam) dan generasi kedua (lebih dari 24 jam) sebagai efek dari perbedaan kecepatan metabolisme, aktivitas metabolit dan kecepatan eliminasi (Linn, *et al.*, 2009). Generasi pertama terdiri dari esetoheksamid, klorpropamid, tolazamid dan tolbutamid. Dan generasi kedua terdiri dari glimepirid, glipizid, dan gliburid. Pada dosis yang ekuipoten, kedua golongan memiliki efek yang sama dalam menurunkan kadar glukosa dalam darah (Dipiro, *et al.*, 2005).

c. Biguanida

Metformin merupakan obat golongan biguanida. Mekanisme kerjanya adalah dengan meningkatkan sensitivitas insulin pada hati dan jaringan perifer. Sehingga memungkinkan peningkatan pengambilan glukosa jaringan yang sensitive terhadap insulin tersebut. Metformin tidak memiliki efek langsung pada sel- β pankreas, namun berkurangnya kadar insulin dalam darah mencerminkan peningkatan sensitivitas sek terhadap insulin. (Dipiro, *et al.*, 2005). Metformin merupakan pengobatan lini pertama pada kebanyakan pasien diabetes tipe 2 dan dapat dikombinasi dengan beberapa obat antidiabetes lain (Linn, *et al.*, 2009)

d. Tiazolidindion

Dua obat yang termasuk golongan tiazolidindion adalah pioglitazon dan rosiglitazon. Mekanisme kerjanya adalah meningkatkan sensitivitas insulin pada otot, hati dan jaringan adipose (Dipiro, *et al.*, 2005)

e. Penghambat α -glukosidase

Obat yang termasuk golongan penghambat α -glukosidase adalah akarbose dan miglitol. Mekanisme keduanya adalah dengan menurangi kecepatan pencernaan karbohidrat sehingga absorpsi glukosa terhambat. Obat golongan ini dapat menurunkan kadar hiperinsulinemia dan trigliserida posprandial (Linn, et al., 2009).

2.3 Enzim

Enzim adalah suatu polimer biologis yang mengkatalis atau mempercepat reaksi tanpa mengalami perubahan secara permanen sebagai konsekuensi dari keikutsertaannya dalam reaksi yang bersangkutan. Enzim berperan mengkatalisis perubahan satu atau lebih senyawa (substrat) menjadi satu atau lebih senyawa lain (produk) sehingga laju reaksi meningkat setidaknya 10^6 kali lebih cepat dibandingkan jika reaksi tersebut tidak dikatalisis. Laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah suhu, pH, dan konsentrasi substrat (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).

Selain sangat efisien, sifat enzim lainnya yaitu sangat selektif dan spesifik. Enzim bersifat spesifik baik bagi tipe reaksi yang dikatalis maupun substrat yang berkaitan pada reaksi bersangkutan. Enzim hanya bereaksi dengan satu atau beberapa substrat dan hanya mengkatalisis satu macam reaksi kimia. Spesifitas enzim yang tinggi ini memberikan kemampuan sel hidup untuk melaksanakan proses kimiawi secara bersamaan dengan pengontrolan masing-masing proses secara independen (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).

Spesifitas substrat dan efisiensi katalitik yang tinggi ini mencerminkan adanya lingkungan yang sedemikian cermat hanya untuk reaksi tertentu. Lingkungan ini disebut tempat aktif (*active site*) yang umumnya berbentuk celah atau kantong.

Untuk dapat bekerja terhadap suatu substrat, harus ada hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat pada bagian aktif enzim (*active site*) sehingga menghasilkan kompleks enzim-substrat (ES) yang bersifat sementara dan akan terurai jika reaksi yang diinginkan telah selesai. Secara sederhana, hipotesis Michaelis dan Menten mengenai perubahan suatu substrat yang dikatalisis oleh enzim dapat digambarkan sebagai berikut:



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

Persamaan diatas menjelaskan reaksi satu molekul dari masing-masing enzim dan substrat yang akan membentuk kompleks enzim substrat yang kemudian pecah menjadi satu molekul masing-masing enzim dan produk. Tanda panah ganda menunjukkan jenis reaksi yang reversible dimana kompleks enzim substrat dapat kembali membentuk masing-masing molekul enzim dan substrat.

Persamaan Michaelis-Menten memperlihatkan secara matematis hubungan antara kecepatan reaksi v_i yang bervariasi dengan variasi konsentrasi substrat.

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

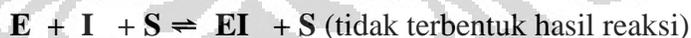
Keterangan : v_i = kecepatan awal reaksi, V_{\max} = kecepatan reaksi maksimal, $[S]$ = konsentrasi substrat, K_m = konstanta Michaelis/ konsentrasi substrat dengan kecepatan awal reaksi (v_i) adalah separuh dari kecepatan maksimal ($V_{\max}/2$).

Konstanta Michaelis (K_m), adalah konsentrasi substrat dengan kecepatan awal reaksi (v_i) adalah separuh dari kecepatan maksimal ($V_{\max}/2$) yang dapat dicapai pada konsentrasi tertentu enzim. Dengan kata lain bahwa K_m konsentrasi substrat saat kecepatan awal adalah separuh dari kecepatan maksimal.

2.3.1 Penghambatan Aktivitas Enzim

Hambatan atau inhibisi pada suatu reaksi yang menggunakan enzim sebagai katalis dapat terjadi apabila ada hambatan pada penggabungan substrata atau pada penghasilan produk. Senyawa yang dapat menghambat reaksi tersebut dinamakan inhibitor. Penghambatan yang dilakukan oleh inhibitor tersebut dapat berupa penghambatan ireversibel atau penghambatan reversibel. Penghambatan ireversibel pada umumnya disebabkan oleh terjadinya proses destruksi atau modifikasi sebuah gugus fungsi atau lebih dari molekul enzim, contohnya terbentuknya ikatan kovalen antara enzim dengan inhibitor. Penghambatan reversibel masih memungkinkan enzim yang diinhibisi kembali dapat bekerja sebagai katalisator setelah tidak adanya inhibitor. Penghambatan jenis ini dapat berupa penghambatan kompetitif dan penghambatan nonkompetitif.

Penghambatan kompetitif terjadi ketika inhibitor yang memiliki struktur menyerupai substrat berikatan dengan bagian aktif enzim membentuk kompleks enzim-inhibitor (EI). Sehingga terjadi persaingan antara inhibitor dengan substrat untuk berikatan dengan bagian aktif enzim melalui reaksi sebagai berikut:



Penghambatan kompetitif menghalangi substrat berikatan dengan enzim dengan membentuk kompleks ikatan EI sehingga tidak terbentuk kompleks ES. Berbeda dengan kompleks ES, kompleks EI ini tidak dapat membentuk produk/hasil reaksi (P).

Penghambatan nonkompetitif terjadi ketika inhibitor berikatan dengan bagian enzim di luar sisi aktif. Penggabungan antara inhibitor dengan enzim dapat terjadi pada enzim bebas (E) maupun pada enzim yang telah mengikat substrat/ kompleks enzim-substrat (ES).



Penggabungan inhibitor dengan enzim bebas menghasilkan kompleks EI, sedangkan penggabungan dengan kompleks ES menghasilkan kompleks ESI. Baik kompleks EI maupun ESI ini bersifat inaktif, dan berarti bahwa kedua kompleks tersebut tidak dapat menghasilkan hasil reaksi yang diharapkan (Poedjiadi, 1994).

2.4 Enzim α -Glukosidase

2.4.1 Definisi

α -Glukosidase dan α -amilase merupakan enzim pankreatik yang memfasilitasi pemecahan karbohidrat kompleks, oligosakarida dan disakarida menjadi monosakarida sehingga dapat diabsorpsi dari lumen usus menuju pembuluh darah (Katzung, Masters, & Trevor, 2009).

Glukosidase tidak hanya penting dalam hal pencernaan karbohidrat tetapi juga penting pada penceranaan glikoprotein dan glikolipid. Glukosidase juga juga terkait pada berbagai gangguan metabolic dan penyakit lainnya seperti diabetes, infeksi virus dan pembentukan sel kanker (Lee, 2000). Oleh karena peranannya tersebut, penghambatan glukosidase menjadi suatu penelitian yang penting untuk mengetahui agen terapeutik yang prospektif serta mekanismenya dalam mengobati penyakit-penyakit tersebut.

Fungsi yang beragam dari glukosidase pada organisme ini memicu penelitian lebih lanjut efek inhibisi terapeutik yang potensial untuk dipakai dalam pengobatan diabetes, obesitas, *glycosphingolipid lysosomal storage disease*, infeksi HIV dan tumor secara umum (de Melo, Gomes, & Carvalho, 2006)

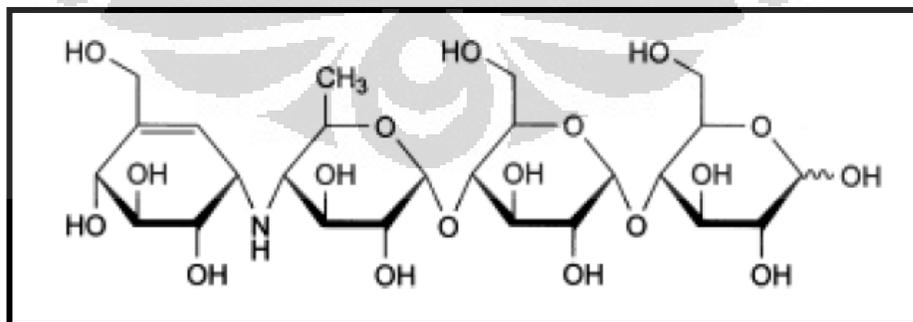
2.4.2 Inhibitor enzim α -Glukosidase

Penghambat α -glukosidase secara kompetitif menghambat enzim α -Glukosidase di usus dan mengurangi lonjakan kadar gula darah setelah makan dengan memperlambat pencernaan dan absorpsi dari pati dan disakarida (Katzung, Masters, & Trevor, 2009).

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

Agen penghambat α -glukosidase dapat digunakan sebagai terapi tunggal atau dikombinasikan dengan pengobatan diabetes lain, karena pasien tidak akan mengalami hipoglikemia dan peningkatan berat badan kecuali digunakan bersamaan dengan insulin atau obat antidiabetes golongan sulfonilurea (Linn, *et al.*, 2009).

Salah satu obat yang termasuk golongan penghambat α -glukosidase ini adalah akarbose. Akarbose merupakan suatu oligosakarida yang diperoleh dari proses fermentasi mikroorganisme *Actinoplanes utahensis*. Akarbose berupa serbuk berwarna putih dengan berat molekul 645,6 dan pKa 5,1 yang bersifat larut dalam air. Rumus empiriknya adalah $C_{25}H_{43}NO_{18}$ dengan struktur kimia sebagai berikut.



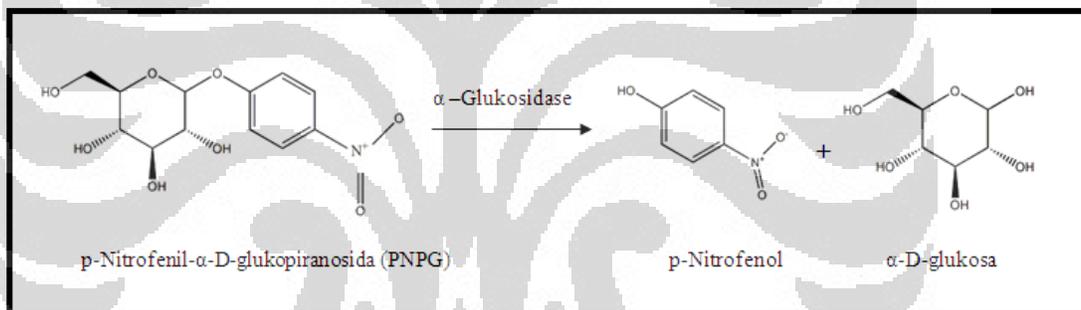
[Sumber : British Pharmacopoeia, 2009]

Gambar 2.3 Struktur Kimia Akarbose

Akarbose memiliki efek yang signifikan dalam menurunkan kadar glukosa darah. Dosis akarbose dimulai dengan dosis rendah (25 mg satu kali sehari), kemudian ditingkatkan secara bertahap setelah beberapa bulan sampai dosis maksimum (50 mg tiga kali sehari untuk pasien ≤ 60 kg atau 100 mg tiga kali sehari untuk pasien > 60 kg) (Dipiro, *et al.*, 2005).

2.4.3 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glukosidase

Uji aktivitas penghambatan α -glukosidase dilakukan secara *in vitro* dengan reaksi enzimatik dan pengukuran secara spektrofotometri. Enzim α -glukosidase akan menghidrolisis p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida menjadi p-nitrofenol (berwarna kuning) dan glukosa dengan mekanisme reaksi sebagai berikut :



[sumber: telah diolah kembali dari Kikkoman, 2001.]

Gambar 2.4 Reaksi Enzimatik α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida

Aktivitas enzim diukur berdasarkan hasil pengukuran absorbansi p-nitrofenol (berwarna kuning). Intensitas warna kuning yang terbentuk ditentukan absorbansinya dengan menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 400 nm. Metode spektrofotometri digunakan karena mudah dilakukan dan mampu memberikan hasil yang akurat, cepat, dan tepat untuk jumlah sampel yang banyak (Eisenthal & Danson, 2002). Apabila ekstrak tanaman memiliki kemampuan menghambat aktivitas α -glukosidase maka p-nitrofenol yang dihasilkan akan berkurang.

2.4.4 Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim α -Glukosidase

Penentuan kinetika penghambatan enzim diukur dengan meningkatkan konsentrasi p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida sebagai substrat, baik dengan maupun tanpa adanya penghambat α -glukosidase (ekstrak) pada beberapa konsentrasi yang berbeda. Dalam menghitung kinetika penghambatan enzim, umumnya membutuhkan konsentrasi substrat yang cukup tinggi untuk mencapai kondisi jenuh. Bentuk linier persamaan Michaelis-Menten memungkinkan V_{\max} dan K_m diekstrapolasikan dari data kecepatan awal yang diperoleh pada konsentrasi substrat lebih rendah dari konsentrasi jenuh. Dimulai dari persamaan (2.2) menjadi bentuk regresi linier dari Persamaan Michaelis- Menten, (Murray, Granner, & Rodwell, 2009, hal.70-71) :

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

dibalik

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

faktor

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

dan disederhanakan

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.5)$$

Jenis inhibisi kemudian ditentukan dengan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten. Konstanta Michaelis (K_m), pada persamaan diatas adalah konsentrasi substrat dengan kecepatan awal reaksi (v_i) adalah separuh dari kecepatan

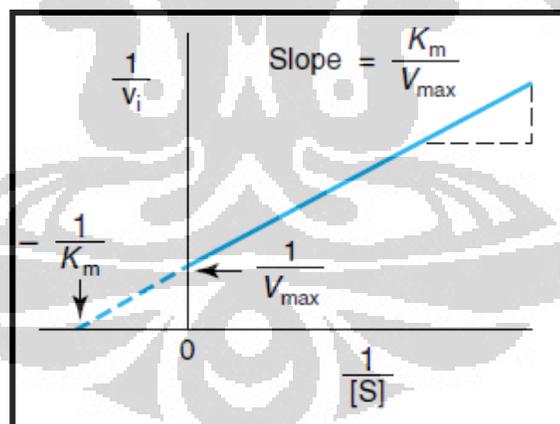
maksimal ($V_{\max}/2$) yang dapat dicapai pada konsentrasi tertentu enzim. Oleh karena itu K_m memiliki besaran konsentrasi substrat.

Persamaan (2.5) adalah persamaan dalam suatu garis lurus $y = ax + b$, di mana $y = 1/v_i$ dan $x = 1/[S]$. $1/v_i$ sebagai fungsi y (absorbansi sampel) sebidang dengan $1/[S]$ sebagai fungsi dari x (jumlah substrat) sehingga memberikan garis lurus yang memotong sumbu y adalah $1/V_{\max}$ dan dengan kemiringan K_m/V_{\max} . Plot seperti itu disebut Plot resipokal-ganda atau Lineweaver-Burk (Gambar 2.5)

Dengan menempatkan y pada persamaan (2.6) di nol dan menghitung x diperoleh bahwa garis memotong di $-1/K_m$.

$$0 = ax + b; \text{ maka, } x = \frac{-b}{a} = \frac{-1}{K_m} \quad (2.6)$$

Oleh karena itu K_m mudah dihitung dari nilai negatif garis memotong sumbu x .



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

Gambar 2.5 Plot Resipokal-Ganda atau Lineweaver-Burk $1/v_i$ versus $1/[S]$ yang digunakan untuk mengevaluasi nilai K_m dan V_{\max}

Metode Lineweaver-Burk membedakan antara inhibisi kompetitif dan non kompetitif berdasarkan pada apakah inhibisi menghilang atau tidak

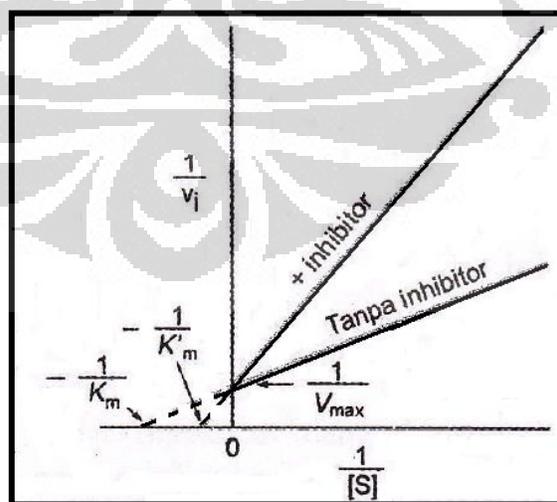
Universitas Indonesia

menghilang ketika konsentrasi substrat ditingkatkan. Kinetika inhibisi enzim ditentukan dengan meningkatnya konsentrasi substrat baik ada atau tidak adanya penghambat (ekstrak).

a. Inhibisi kompetitif

Inhibisi kompetitif klasik terjadi pada tapak ikatan substrat (katalitik). Pada umumnya, struktur kimia sebuah *inhibitor* (I) menyerupai struktur kimia substrat (S) atau biasa disebut analog substrat. Inhibitor (I) dapat berikatan secara reversibel dengan enzim (E) sehingga yang seharusnya membentuk kompleks Enzim-Substrat (ES), justru membentuk kompleks Enzim-Inhibitor (EI). Jika Substrat (S) dan Inhibitor (I) sama-sama ada, maka akan saling bersaing untuk memperebutkan tapak ikatan yang sama pada permukaan enzim (E).

Untuk inhibisi kompetitif klasik, garis yang menghubungkan titik data eksperimen bertemu di sumbu y (Gambar 2.6). Karena perpotongan sumbu $y = 1/V_{max}$, pola ini menunjukkan bahwa ketika $1/[S] = 0$, v_i tidak bergantung pada keberadaan inhibitor atau akan sama seperti pada keadaan tanpa penghambat (ekstrak). Pada plot dibawah terlihat hilangnya inhibisi secara total pada konsentrasi substrat [S] yang tinggi.



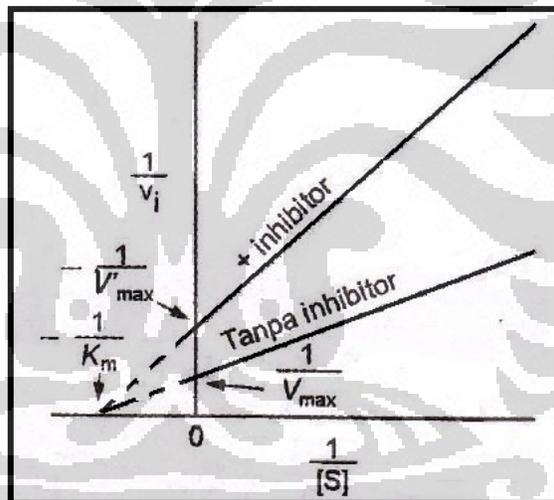
[Sumber : Murray, Granner, & Rodwell, 2009]

Gambar 2.6 Plot Lineweaver-Burk dari Inhibisi Kompetitif

Universitas Indonesia

b. Inhibisi nonkompetitif

Pada inhibisi nonkompetitif, pengikatan inhibitor tidak mempengaruhi pengikatan substrat, dan tidak terdapat persaingan antara penghambat (ekstrak) dengan substrat. Pembentukan kompleks Enzim-Inhibitor (EI) dan Enzim-Inhibitor-Substrat (EIS) mungkin saja terjadi. Namun, sementara kompleks Enzim-Inhibitor (EI) masih bisa mengikat substrat, maka akan diubah menjadi produk. Untuk inhibisi non kompetitif sederhana, Enzim (E) dan Enzim-Inhibitor (EI) memiliki afinitas yang sama terhadap substrat (S) namun efisiensi mengubah substrat menjadi produk yang tercermin oleh V_{max} berkurang.



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

Gambar 2.7 Plot Lineweaver-Burk untuk Inhibisi Non Kompetitif

Plot diatas menunjukkan bahwa pada sampel dengan inhibitor dan konsentrasi substrat yang besar, aktivitas inhibisi tidak sama seperti pada keadaan tanpa inhibitor. Inhibisi non kompetitif yang lebih kompleks terjadi ketika pengikatan inhibitor (I) juga mempengaruhi afinitas enzim terhadap substrat yang menyebabkan perpotongan garis terjadi pada kuadran tiga atau

keempat pada Plot Lineweaver-Burk yang dalam hal ini tidak diperlihatkan. Inhibitor tertentu semacam ini menunjukkan aktivitas campuran inhibisi kompetitif dan nonkompetitif.

2.5 Teknik Pemisahan

2.5.1 Simplisia dan Ekstrak

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1979). Simplisia dibedakan menjadi simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan ialah isi sel yang secara spontan keluar dari tumbuhan atau isi sel yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya, atau senyawa nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya dan belum berupa senyawa kimia murni (Depkes RI, 2000)

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 1995).

2.5.2 Teknologi Ekstraksi (Depkes RI, 2000)

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia tertentu dengan pelarut yang sesuai sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dalam pelarut tersebut. Tahap awal pembuatan ekstrak adalah pembuatan serbuk simplisia kering. Apabila telah diperoleh serbuk simplisia kering, maka selanjutnya dilakukan pemilihan pelarut yang sesuai. Beberapa faktor utama yang menjadi pertimbangan dalam pemilihan pelarut adalah selektivitas pelarut, kemudahan bekerja dengan pelarut, harga pelarut, pengaruh terhadap lingkungan, dan keamanan. Selain faktor-faktor tersebut, peraturan pemerintah dalam hal ini juga turut membatasi, cairan pelarut mana yang

Universitas Indonesia

diperbolehkan dan dilarang. Pada prinsipnya cairan pelarut harus memenuhi syarat kefarmasian. Sampai saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang diperbolehkan adalah air dan etanol serta campurannya. Penggunaan campuran etanol-air lebih dipilih karena memiliki toksisitas yang lebih rendah dibandingkan dengan etanol absolut serta ekstrak yang dihasilkan lebih stabil dibandingkan dengan ekstrak air. Jenis pelarut lain seperti metanol, kloroform, heksana, aseton, dan toluen umumnya digunakan sebagai pelarut untuk tahap separasi dan tahap pemurnian (fraksinasi).

Ketika serbuk simplisia kering dan pelarut sudah disiapkan, maka ekstraksi dapat dilakukan. Setelah ekstraksi selesai dilakukan, pada beberapa penelitian dilanjutkan dengan proses separasi dan pemurnian untuk memisahkan senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa mempengaruhi senyawa yang dikehendaki sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni dan stabilitas kandungan yang tetap terjaga. Apabila telah diperoleh ekstrak yang dikehendaki, selanjutnya dilakukan pemekatan atau pengeringan ekstrak sehingga diperoleh ekstrak kental atau ekstrak kering dimana hasil penimbangan berat ekstrak ini dapat digunakan untuk menghitung rendemen ekstrak. Berikut ini akan dibahas beberapa metode ekstraksi yang menggunakan pelarut.

2.5.2.1 Cara Dingin

a. Maserasi

Maserasi adalah ekstraksi simplisia dengan cara mengocok atau mengaduk simplisia dengan pelarut selama beberapa kali pada temperatur ruangan (kamar). Metode ini didasarkan pada prinsip pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu, sedangkan remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya.

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru hingga sempurna dimana ekstraksi umumnya dilakukan pada suhu ruangan dalam alat perkolator. Tahap-tahap dalam perkolasi adalah tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, dan tahap perkolasi sesungguhnya (penetesan dan penampungan ekstrak) secara terus-menerus hingga diperoleh perkolat dengan jumlah 1-5 kali bahan.

Berhasilnya suatu proses perkolasi dipengaruhi oleh selektivitas pelarut, kecepatan aliran pelarut dan suhu. Selektivitas pelarut sangat penting, baik dari segi tujuannya untuk menyari senyawa yang dikehendaki dan dari segi komposisi kualitatif dan kuantitatif senyawa yang bersangkutan. Kecepatan aliran pelarut akan mempengaruhi waktu kontak pelarut dengan bahan yang akan diekstraksi (Kusmardiyani & Nawawi, 1992).

2.5.2.2 Cara Panas

a. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada titik didihnya selama waktu tertentu dimana jumlah pelarut yang digunakan terbatas dan relatif konstan selama ekstraksi dilakukan dengan adanya pendingin balik. Pada ekstraksi cara refluks umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama hingga 3-5 kali sehingga cara ekstraksi ini termasuk dalam proses ekstraksi sempurna.

b. Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru, bahan yang akan diekstraksi berada dalam tabung berpori kemudian ditempatkan didalam alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

c. Digesti

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

d. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada suhu penangas air dimana bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih bersuhu 96-98°C yang dijaga konstan selama waktu tertentu (15-20 menit).

e. Dekok

Dekok adalah infus dengan waktu yang lebih lama (umumnya lebih dari 30 menit) dan suhu mencapai titik didih air.

2.5.3 Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas)

Teknik kromatografi yang sering digunakan yaitu kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis, kromatografi kertas dan kromatografi gas. Sebagai adsorban selain kertas digunakan juga zat penyerap berpori misalnya aluminium oksida, silika gel, dan selulosa. Kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis umumnya digunakan untuk identifikasi, karena cara ini khas dan mudah dilakukan untuk senyawa yang mudah menguap dan untuk identifikasi dan penetapan kadar, sedangkan kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan senyawa dalam jumlah yang lebih banyak (Harborne, 1987).

2.5.3.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi (pembagian) atau gabungannya. Metode

pemisahan ini menggunakan lapisan tipis adsorben sebagai media pemisahan (Kusmardiyani & Nawawi, 1992).

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

Kromatografi lapis tipis biasanya digunakan untuk pengecekan yang cepat terhadap komposisi campuran, menentukan kondisi percobaan dari kromatografi kolom, mengetahui kesempurnaan suatu reaksi, dan untuk identifikasi obat, ekstrak tanaman, preparat biokimia, serta mendeteksi kontaminan dan pemalsuan. Kelebihan dari teknik ini ialah dapat dilakukan dengan peralatan sederhana dan waktu yang cukup singkat (15-60 menit), dengan jumlah sampel yang cukup kecil dan hasil pemisahan yang paling jelas dibandingkan kromatografi kertas dan kromatografi kolom. Metode pemisahan didasarkan atas penyerapan, partisi atau gabungannya.

Adapun kekurangan dari metode kromatografi lapisan tipis adalah harga R_f yang diperoleh tidak tetap jika dibandingkan dengan yang diperoleh pada kromatografi kertas. Oleh karena itu pada lempeng yang sama disamping kromatogram dari zat yang diperiksa perlu dibuat kromatogram dari zat pembanding kimia, lebih baik dengan kadar yang berbeda-beda. Perkiraan identifikasi diperoleh dengan pengamatan 2 bercak dengan harga R_f dan ukuran yang lebih kurang sama (Depkes RI, 1995). Adapun beberapa contoh zat penyerap yang digunakan untuk pemisahan dalam kromatografi lapisan tipis adalah sebagai berikut:

Tabel 2.2 Zat penyerap untuk Kromatografi Lapisan Tipis

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

[Sumber : Sastrohamidjojo, 1985]

2.5.3.2 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan metode kromatografi cair yang baik digunakan untuk pemisahan campuran dengan skala besar yaitu lebih dari 1 gram. Pada proses pemisahan ini campuran yang akan dipisahkan diletakkan pada bagian atas kolom adsorben yang berada pada suatu tabung gelas. Pelarut sebagai fase gerak karena gaya berat atau karena adanya dorongan dengan tekanan tertentu dibiarkan mengalir pada kolom membawa serta pita linarut yang bergerak dengan kecepatan berbeda. Linarut yang telah memidah dikumpulkan berupa fraksi yang keluar dari bagian bawah kolom (Kusmardiyani & Nawawi, 1992).

Kromatografi kolom terbagi dua jenis yaitu kromatografi kolom lambat dan kromatografi kolom dipercepat. Pada kromatografi kolom dipercepat, pelarut pengembang didorong dengan cepat (dengan tekanan gas) melalui kolom bergaris tengah besar tetapi pendek yang berisi penyerap basah yang ukuran partikelnya dikendalikan dengan ketat (Gritter, Bobbit, & Schwarting, 1985).

2.6 Spektroskopi

2.6.1 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrum UV-Vis merupakan hasil interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dengan molekul. Radiasi elektromagnetik dianggap sebagai energi yang merambat dalam bentuk gelombang (Gandjar & Rohman, 2007).

Spektrofotometer UV-Vis digunakan terutama untuk analisa kuantitatif, tetapi dapat juga untuk analisa kualitatif. Untuk analisa kualitatif yang diperhatikan adalah membandingkan λ maksimum, serapan, daya serap dan spektrum serapannya. Pengukuran serapan dapat dilakukan pada panjang gelombang daerah ultraviolet (panjang gelombang 190 nm – 380 nm) atau pada daerah cahaya tampak (panjang gelombang 380 nm – 780 nm).

Spektrum serapan adalah suatu grafik yang menghubungkan antara banyaknya sinar yang diserap dengan frekuensi atau panjang gelombang sinar. Banyaknya sinar yang diabsorpsi pada panjang gelombang tertentu sebanding dengan banyaknya molekul yang menyerap radiasi, sehingga spektrum serapan juga dapat digunakan untuk analisis kuantitatif (Gandjar & Rohman, 2007).

Senyawa atau zat yang dapat diperiksa adalah yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang lebih dikenal dengan istilah kromofor. Senyawa yang mengandung gugus kromofor akan menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak jika diikat oleh senyawa-senyawa bukan pengabsorpsi (auksokrom). Gugus auksokrom yaitu gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas seperti : -OH; -O; -NH₂; dan -OCH₃. Terikatnya gugus auksokrom pada gugus kromofor akan mengakibatkan pergeseran pita absorpsi menuju panjang gelombang yang lebih besar disertai dengan peningkatan intensitas (Gandjar & Rohman, 2007).

Pengukuran serapan dapat dilakukan pada panjang gelombang daerah ultraviolet (panjang gelombang 190 nm – 380 nm) atau pada daerah cahaya tampak (panjang gelombang 380 nm – 780 nm). Pengukuran serapan dari

suatu sampel dapat dilakukan dengan perhitungan Lambert-Beer sebagai berikut:

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = \epsilon \cdot b \cdot c$$

dimana : A = serapan

a = daya serap

b = tebal lapisan zat yang menyerap sinar (cm)

c = kadar (g/L)

ϵ = absorpsivitas molekuler ($\text{mol} \cdot \text{cm} \cdot \text{L}^{-1}$)

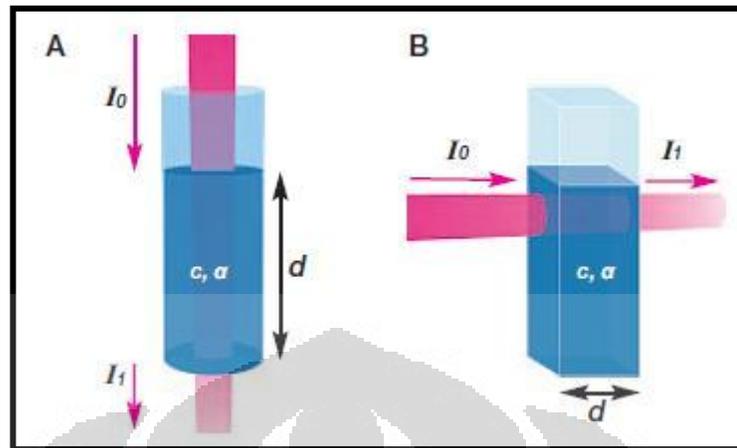
I_0 = Intensitas sinar datang

I_t = Intensitas sinar yang diteruskan

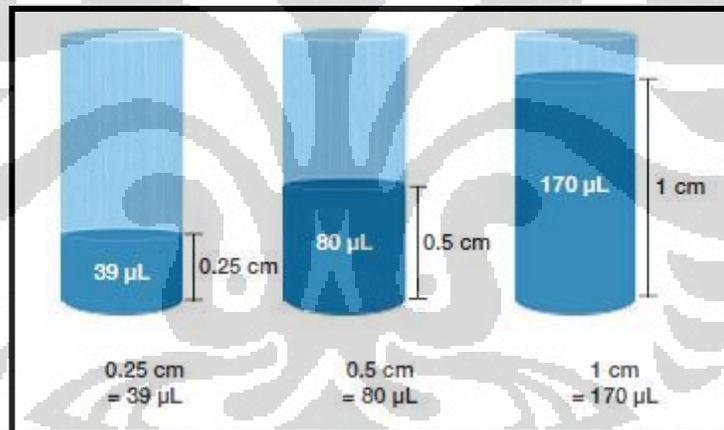
Pemilihan pelarut yang digunakan dalam spektrofotometer UV sangat penting, pelarut tidak boleh mengabsorpsi cahaya pada daerah panjang gelombang dimana dilakukan pengukuran sampel. Umumnya pelarut yang tidak mengandung sistem terkonjugasi sesuai untuk digunakan dalam spektrofotometer UV-Vis. Pelarut yang umum digunakan adalah air, etanol, metanol, dan n-heksan, karena pelarut ini transparan pada daerah UV.

2.6.2 Spektroskopi UV/Vis dalam *Microplate* (Greiner Bio-One, 2008)

Panjang jalur sampel pengukuran transmisi pada standar kuvet adalah 1 cm karena hampir semua kuvet memiliki tebal standar 1 cm. Berbeda dengan pengukuran densitas optik pada *microplate*, panjang jalur ditentukan berdasarkan jumlah dan ketinggian cairan sampel yang terisi dalam sumuran (Gambar 2.8 dan Gambar 2.9).



Gambar 2.8 Variasi Jalur Sampel dalam Sumuran *Microplate* (A) dan Jalur Sampel pada Kuvet (B)



Gambar 2.9 Hasil Jalur Sampel dengan Perbedaan Volume Sampel pada Sumuran *Microplate*

Pengukuran densitas optik pada sumuran *microplate* dibandingkan secara langsung dengan pengukuran menggunakan kuvet, hasil dari sumuran *microplate* harus dihitung ulang dengan panjang jalur 1 cm. Perhitungan ulang dapat dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$\text{OD } 1 \text{ cm} = \frac{\text{OD sampel}}{d \text{ (cm)}}$$

2.7 Penapisan Fitokimia

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

2.7.1 Alkaloid

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

2.7.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa yang umumnya terdapat pada tumbuhan berpembuluh. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai glikosida dan aglikon flavonoid. Kebanyakan senyawa flavonoid berada dalam bentuk glikosida (Kusmardiyani & Nawawi, 1992). Biasanya dalam menganalisis flavonoid, yang diperiksa ialah aglikon dalam ekstrak tumbuhan yang sudah dihidrolisis.

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

2.7.3 Terpen

Terpen adalah suatu senyawa yang tersusun dari isopren $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ dan memiliki kerangka karbon yang dibangun oleh

Universitas Indonesia

penyambungan dua atau lebih satuan unit isopren ini. Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa seperti monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap, diterpen yang sukar menguap dan yang tidak menguap, triterpen, dan sterol (Harborne, 1987).

Secara umum terpen larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya terpen diekstraksi dengan menggunakan eter dan kloroform dan dapat dipisahkan dengan cara kromatografi pada silika gel atau alumina memakai pelarut tersebut. Saponin dan glikosida jantung merupakan golongan senyawa triterpen atau steroid yang terdapat dalam bentuk glikosida (Harborne, 1987). Senyawa ini biasanya diidentifikasi dengan reaksi Lieberman-Bouchardat (anhidrat asetat- H_2SO_4) yang memberikan warna hijau kehitaman sampai biru.

2.7.4 Tanin

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

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

2.7.5 Saponin

Saponin adalah glikosida triterpen yang merupakan senyawa aktif permukaan dan dapat menimbulkan busa jika dikocok dengan air. Pada

Universitas Indonesia

konsentrasi yang rendah dapat menyebabkan hemolisis sel darah merah pada tikus (Harborne, 1987). Identifikasi saponin dapat dilakukan dengan mengocok ekstrak bersama air hangat di dalam tabung reaksi dan akan timbul busa yang dapat bertahan lama, setelah penambahan HCl 2N busa tidak hilang.

2.7.6 Glikosida

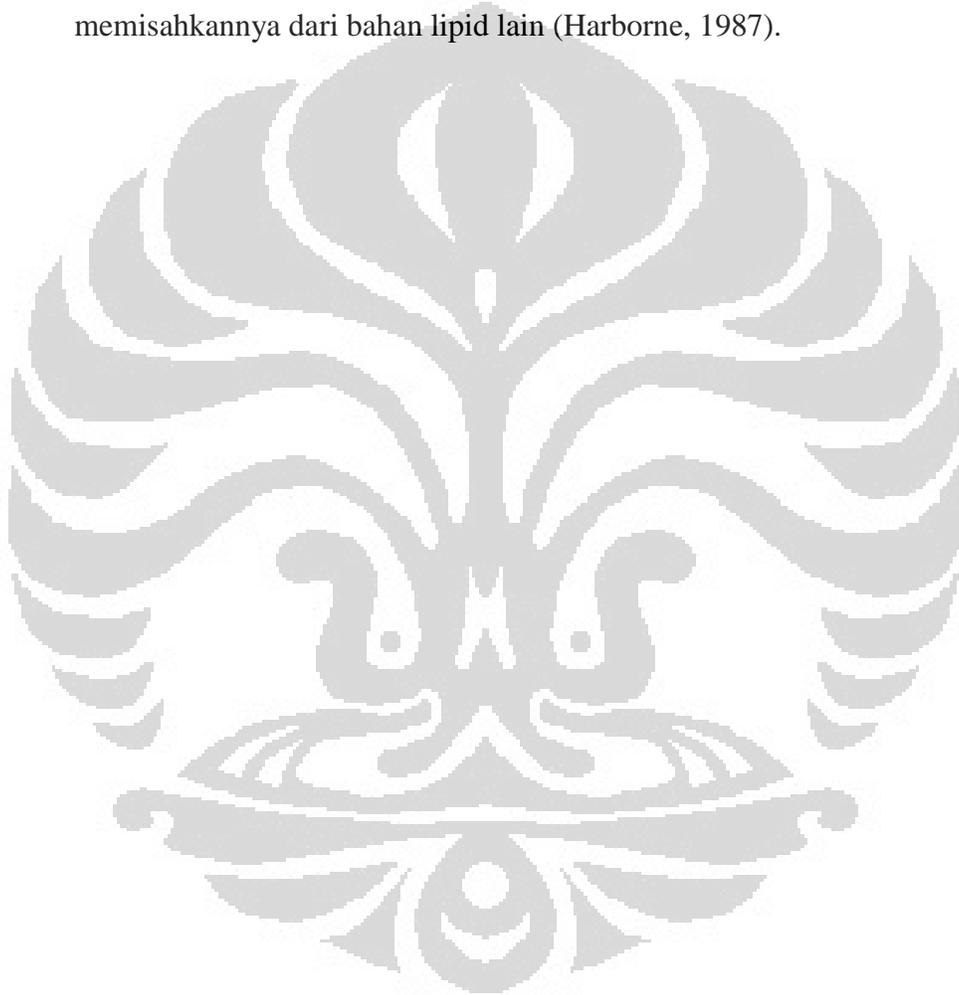
Glikosida merupakan suatu senyawa yang bila dihidrolisis akan terurai menjadi gula (glikon) dan senyawa lain (aglikon atau genin). Pada umumnya glikon berupa glukosa, fruktosa, laktosa, galaktosa dan manosa. Dapat pula berupa gula khusus seperti samentosa, oleandrosa, simarosa dan rutinosa. Sedangkan aglikon (genin) biasanya mempunyai gugus -OH dalam bentuk alkoholis atau fenolis. Glikosida dapat dibedakan menjadi α -glikosida dan β -glikosida. Pada tanaman, glikosida biasanya terdapat dalam bentuk β -glikosida. Kegunaan glikosida bagi tanaman adalah untuk cadangan gula sementara, sedangkan bagi manusia umumnya digunakan untuk obat jantung, diuretika, dan prekursor hormon steroid.

2.7.7 Kuinon dan Antrakuinon

Kuinon meliputi sejumlah besar pigmen alam yang terutama diperoleh dari tanaman. Pada umumnya kuinon berwarna kuning, merah atau coklat, tetapi dalam bentuk basa hidroksi kuinon berubah warna menjadi ungu, biru, atau hijau. Kuinon alam memegang peranan penting dalam tumbuhan pada proses oksidasi-reduksi dan beberapa di antaranya bersifat antibiotik (Kusmardiyani & Nawawi, 1992).

Kuinon alam dikelompokkan menjadi antrakuinon, naftokuinon dan benzokuinon. Antrakuinon merupakan kelompok kuinon yang paling besar. Di alam, antrakuinon kemungkinan berada dalam bentuk bebas, glikosida dan antron (bentuk tereduksi) (Kusmardiyani & Nawawi, 1992).

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



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penelitian Fitokimia, Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kualitatif, Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif, dan Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi FMIPA UI selama lebih kurang 5 bulan dari bulan Februari hingga Juni 2012.

3.2 Bahan

3.2.1 Bahan Uji

Pada penelitian ini bahan yang digunakan adalah bagian daun dari tanaman *Anacardium occidentale L.* yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik. Simplisia tersebut telah diidentifikasi oleh Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

3.2.2 Bahan Kimia dan lain-lain

Enzim α -glukosidase yang berasal dari rekombinan *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Aldrich, USA), substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) (Sigma Aldrich, USA), dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck, Jerman), *bovine serum albumin* (BSA) (Merck, Jerman), akarbose (didapat dari PT Dexa Medica), natrium karbonat (Merck, Jerman), kalium dihidrogenfosfat (Analar), dikalium hidrogenfosfat (Merck, Jerman), heksana teknis, diklorometana teknis, etil asetat teknis, butanol teknis, metanol teknis, aseton, akuades, air demineralisata, asam klorida (Merck, Jerman), lempeng kromatografi lapis tipis silika gel 60 F₂₄₅ (Merck, Jerman), asam klorida (Merck, Jerman), vanillin (Merck, Jerman), asam sulfat (Merck, Jerman),

kuersetin (Merck, Jerman), aluminium (III) klorida, besi (II) klorida, anisaldehyd, asam asetat anhidrat (Merck, Jerman).

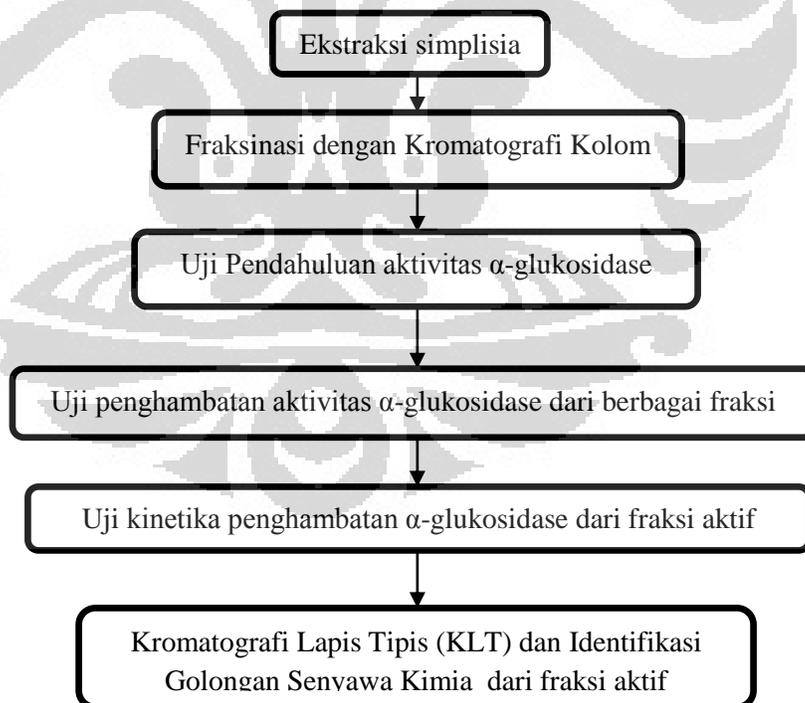
3.3 Alat

Lemari pendingin, ayakan, oven (Hotpack vacuum oven), timbangan analitik, *rotary vacuum evaporator* (Janke & Kunkel IKA, Jerman), pH meter (Eutech Instruments), *shaker*, vortex mixer (VM 2000 Digisystem), microplate reader (Biotek ELX 808), pipet mikro (Finnipipette dan Eppendorf), alat fluoresensi (Camag), inkubator (Mettler), kolom kromatografi, pelat panas elektrik, dan alat-alat gelas.

3.4 Prosedur Pelaksanaan

3.4.1 Skema Kerja

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap seperti diperlihatkan pada skema prosedur pelaksanaan di bawah ini.



Gambar 3.1 Skema Prosedur Pelaksanaan

3.4.2 Ekstraksi Simplisia

Metode ekstraksi yang digunakan adalah refluks bertingkat. Pertama ditimbang Serbuk daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) sebanyak 2 kg dan dimasukkan masing-masing 1 kg ke dalam labu refluks kemudian ditambahkan heksana sebagai cairan penyari sampai seluruh serbuk terendam seluruhnya atau hingga tinggi serbuk $\frac{2}{3}$ tinggi pelarut heksana. Kemudian dilakukan refluks, yaitu dipanaskan selama 30 menit lalu dibiarkan hingga dingin.

Selanjutnya cairan penyari dipisahkan dari ampas dan disimpan dalam wadah penampung. Selanjutnya ampas diekstraksi kembali dengan cara yang sama. Refluks diulangi hingga lapisan pelarut heksana tidak pekat lagi atau hampir jernih. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 50°C dan kecepatan 30 rpm. Ampas dari ekstraksi tersebut kemudian dikeringkan di dalam lemari asam dan ditambahkan dengan etil asetat, dan methanol berturut-turut dengan perlakuan yang sama seperti refluks tingkat pertama dengan heksana. Skema ekstraksi simplisia daun jambu mete dapat dilihat pada Gambar 3.2.

3.4.3 Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan metode kromatografi kolom dengan fase diam silika gel dan fase gerak campuran heksana dan etil-asetat serta campuran etil asetat dan metanol. Pelarut dipilih berdasarkan kemampuan pemisahan yang baik yang dapat dilihat dari bercak pada hasil elusi KLT. Ekstrak dimasukkan dengan cara kering dan dialiri fase gerak dengan metode gradien. Setiap fraksi ditampung setiap 50 ml dan disatukan berdasarkan profil kromatografi lapis tipis nya. Hasil fraksi yang didapat kemudian diuji efek penghambatannya terhadap enzim α -glukosidase. Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 3.3.

3.4.4 Uji Penghambatan Aktivitas Enzim α -Glukosidase

3.4.4.1 Penyiapan Larutan Pereaksi

a. Pembuatan dapar fosfat pH 6,8

Larutan dapar fosfat pH 6,8 dibuat dari campuran larutan 1 M dikalium hidrogen fosfat (K_2HPO_4) dan larutan 1 M kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4). Larutan 1 M kalium dihidrogen fosfat dibuat dengan cara melarutkan 68,045 g kalium dihidrogen fosfat dalam 500 mL akuademineralisata bebas CO_2 . Sedangkan 0,1 M dikalium hidrogen fosfat dibuat dengan cara 87,09 g dikalium hidrogen fosfat dalam 500 mL akuademineralisata bebas CO_2 . Campuran larutan kemudian disesuaikan pH nya hingga pH 6,8

b. Larutan Uji Fraksi Ekstrak Daun *Anacardium occidentale L.*

Fraksi ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan dimetil sulfoksida (DMSO) secukupnya kemudian dicukupkan larutannya hingga 10 ml dengan dapar fosfat pH 6,8 sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 1000 μ g/mL. Larutan ekstrak 1000 μ g/mL diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 100; 75; 50; 25; 10; 5 μ g/mL.

c. Perhitungan Unit Enzim dan Pembuatan Larutan Enzim α -Glukosidase

Perhitungan unit enzim :

Label yang terdapat pada kemasan enzim adalah 15,2 mg; 23% protein; 215 U/mg protein.

Jumlah protein total di dalam kemasan :

$$23\% \times 15,2 \text{ mg} = 3,49 \text{ mg protein}$$

Persamaan bobot solid dan satuan unit :

$$15,2 \text{ mg solid} \sim 3,496 \text{ mg protein}$$

$$x \text{ mg solid} \sim 1 \text{ mg protein} , \text{ maka } 15,2 \text{ mg solid} / 3,496 \text{ protein} = 4,348 \text{ mg solid}$$

1 mg protein ~ 4,348 mg solid ~ 215 unit

Jumlah unit enzim di dalam kemasan 15,2 mg solid :

$$15,2 \text{ mg solid} / 4,348 \text{ mg solid} \times 215 \text{ unit} = 751,60 \text{ unit}$$

Perhitungan penimbangan solid enzim untuk mencapai aktivitas target 0,05 U/ml (5 unit/100 ml) :

$$\text{unit}/215 \text{ unit} \times 4,348 \text{ mg solid} = 0,101 \text{ mg solid}$$

Bobot penimbangan menggunakan timbangan analitik halus dengan akurasi baik adalah 5 mg : 4,348 mg solid ~ 215 unit

$$\text{mg solid} \sim 247,24 \text{ unit}$$

Konsentrasi enzim yang digunakan untuk pengujian adalah 0,05 U/ml, maka dilakukan pengenceran dengan dapar fosfat pH 6,8.

a). Pengenceran pertama

Timbang 5,06 mg solid enzim (250 unit) kemudian volume dicukupkan hingga 100 ml dengan dapar fosfat pH 6,8. Konsentrasi yang diperoleh :

$$\frac{250 \text{ unit}}{100 \text{ ml}} = 2,5 \text{ U/ml}$$

b). Pengenceran kedua

Pipet larutan pengenceran pertama sebanyak 2 ml, kemudian volume dicukupkan hingga 100 ml dengan dapar fosfat pH 6,8. Konsentrasi yang diperoleh :

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

Larutan pembawa enzim dibuat dengan cara 200 mg bovine serum albumin (BSA) dilarutkan dalam 100 ml dapar fosfat pH 6,8.

d. Perhitungan dan Pembuatan Larutan Substrat

BM p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG): 301,25 (Sigma, 2011)

1. Dibuat larutan PNPG 100 mL dengan konsentrasi 20 mM

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

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

$$mg = \frac{20 \times 301,25 \times 50,0}{1000} = 301,25 \text{ mg}$$

Larutan substrat 20 mM dibuat dengan cara sebanyak 301,25 mg p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida ditimbang kemudian dilarutkan dalam 50,0 mL aquademineralisata.

Larutan substrat 20 mM diencerkan sehingga diperoleh larutan substrat 10 mM; 5 mM; 2,5 mM; 1,25 mM; dan 0,625 Mm.

2. Dibuat larutan PNPG 50 mL dengan konsentrasi 10 mM

Dipipet sebanyak 25 ml larutan PNPG 20 mM dan dicukupkan volumenya hingga 50 ml aqua demineralisata. Konsentrasi yang diperoleh :

$$\frac{25 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times 20 \text{ mM} = 10 \text{ mM}$$

3. Dibuat larutan PNPG 50 mL dengan konsentrasi 5 mM

Dipipet sebanyak 25 ml larutan PNPG 10 Mm dan dicukupkan volumenya hingga 50 ml dengan aqua demineralisata. Konsentrasi yang diperoleh :

$$\frac{25 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times 10 \text{ mM} = 5 \text{ mM}$$

4. Dibuat larutan PNPG 50 mL dengan konsentrasi 2,5 mM

Dipipet sebanyak 25 ml larutan PNPG 5 mM dan dicukupkan volumenya hingga 50 ml dengan aqua demineralisata. Konsentrasi yang diperoleh :

$$\frac{25 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times 5 \text{ mM} = 2,5 \text{ mM}$$

5. Dibuat larutan PNPG 50 mL dengan konsentrasi 1,25 mM

Dipipet sebanyak 25 ml larutan PNPG 2,5 mM dan dicukupkan volumenya hingga 50 ml dengan aqua demineralisata. Konsentrasi yang diperoleh :

$$\frac{25 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times 2,5 \text{ mM} = 1,25 \text{ mM}$$

6. Dibuat larutan PNPG 50 mL dengan konsentrasi 0,625 mM

Dipipet sebanyak 25 ml larutan PNPG 1,25 mM dan dicukupkan volumenya hingga 50 ml dengan aqua demineralisata. Konsentrasi yang diperoleh :

$$\frac{25 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times 1,25 \text{ mM} = 0,625 \text{ mM}$$

e. Larutan Standar Akarbose

Larutan akarbose digunakan sebagai pembanding. Akarbose ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dalam DMSO hingga larut kemudian dicukupkan volume nya dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga 5 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan akarbose 1000 ppm kemudian diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan akarbose 150 ppm, 100 ppm, 75 ppm, 50 ppm, 25 ppm.

3.4.4.2 Uji Pendahuluan Kerja Enzim (Kikkoman, 2001; Sigma-Aldrich, 2012).

Sebelum dilakukan uji efek penghambatan aktivitas α -glukosidase, dilakukan terlebih dahulu uji pendahuluan untuk mengetahui kondisi optimal enzim bekerja. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan kemungkinan penurunan kerja enzim akibat perbedaan kondisi inkubasi diantaranya waktu inkubasi dan konsentrasi substrat. Dari uji ini ditentukan konsentrasi substrat yang digunakan pada reaksi enzimatik agar reaksi berlangsung optimal yang ditandai dengan terikatnya semua enzim oleh substrat. Uji dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi substrat 20 mM; 15 mM; 10 mM; 5mM; 2,5

mM; 1,25 mM; dan 0,625 Mm, serta variasi waktu inkubasi yaitu 15, 20, dan 30 menit.

a. Pengujian larutan uji

Pengujian dilakukan dengan cara 10 μL substrat (p-nitrofenil- α -Dglukopiranos) dengan konsentrasi 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 mM, masing-masing dicampurkan dengan 65 μL dapar fosfat pH 6,8. Selanjutnya diinkubasi pada 37°C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 25 μL larutan enzim 0,05 U/mL, dan selanjutnya diinkubasi selama 30 menit. Setelah itu ditambahkan dengan 100 μL natrium karbonat 200 mM. Larutan uji diukur absorbansinya pada panjang gelombang 405 nm.

b. Prosedur uji larutan blanko

Pengujian dilakukan dengan cara 10 μL p-nitrofenil- α -D-glukopiranos dengan konsentrasi 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 mM, masing-masing dicampurkan dengan 65 μL dapar fosfat pH 6,8. Campuran diinkubasi pada 37°C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 100 μL natrium karbonat 200 mM, dan diinkubasi selama 30 menit. Setelah itu ditambahkan dengan 25 μL larutan enzim 0,05 U/mL. Larutan uji diukur absorbansinya pada panjang gelombang 405 nm.

Tabel 3.1 . Skema penambahan reagen uji pendahuluan enzim α -glukosidase (Basuki, et al., 2002)

Reagen	Volume (μ l)	
	Uji	Blanko
Dapar	65	65
Substrat	10	10
Inkubasi penangas air 37 ⁰ C, 5 menit		
Enzim	25	-
Na ₂ CO ₃	-	100
Inkubasi penangas air 37 ⁰ C, 15/20/30/40 menit		
Enzim	-	25
Na ₂ CO ₃	100	-
Ukur serapan dengan <i>Microplate Reader</i> pada $\lambda = 405 \text{ nm}$		

3.4.4.3 Penafsiran Data

Pada setiap pengujian, hitung aktivitas enzim dengan rumus berikut (Kikkoman, 2001) :

Aktivitas enzim pervolume (U/ml)

$$= \frac{A_{400 \text{ nm uji}} - A_{400 \text{ nm Blanko}} \times V \times df}{18,1 \times Ve \times t} \quad (3.3)$$

$$\text{Aktivitas enzim perbobot (U/mg)} = (\text{U/ml}) \times 1/C \quad (3.4)$$

Keterangan :

V = volume total campuran(ml)

df = faktor pengenceran

18,1 = milimolar koefisien ekstingsi p-Nitrophenol dalam kondisi penetapan kadar pada 405 nm ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$)

Ve = volume larutan enzim (ml)

t = waktu inkubasi

C = jumlah α -glukosidase dalam larutan uji (mg/ml)

Definisi Unit:

Satu unit akan melepaskan 1,0 μmol α -D-glukosa dari p-nitrofenil- α -D-glukosida per menit pada pH 6,8 dan suhu 37⁰C (Sigma-Aldrich, 2012).

3.4.4.4 Uji Penghambatan Aktivitas Enzim α -Glukosidase

a. Pengujian Blanko Negatif (C_0)

Larutan 63 μ L dapar fosfat pH 6,8, 10 μ l p-nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNPG) dan 2 μ l DMSO diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 100 μ L Na_2CO_3 0,2 M untuk memberikan suasana basa agar reaksi enzimatik tidak berjalan. Larutan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, segera ditambahkan 25 μ l larutan enzim 0,05 U/ml. Larutan diukur serapannya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

b. Pengujian Kontrol Blanko (C_1)

Larutan 63 μ l dapar fosfat pH 6,8, 10 μ l p-nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNPG) dan 2 μ l DMSO diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 25 μ l larutan enzim 0,05 U/ml. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah masa inkubasi selesai, segera ditambahkan 100 μ L Na_2CO_3 0,2 M untuk menghentikan reaksi enzimatik. Larutan diukur serapannya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

c. Pengujian Sampel Ekstrak (S_1)

Larutan sampel ekstrak sebanyak 1-40 μ l ditambah dengan 20 μ L dapar fosfat pH 6,8. Total campuran ekstrak dan dapar fosfat ini adalah 65 μ L dengan jumlah masing-masing bervariasi disesuaikan dengan konsentrasi akhir yang diinginkan. Kemudian ditambahkan 10 μ L p-nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNPG) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 25 μ l larutan enzim 0,05 U/ml. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah masa inkubasi selesai, segera ditambahkan 100 μ L Na_2CO_3 0,2 M untuk menghentikan reaksi enzimatik. Larutan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang

gelombang 405 nm. Dihitung persen inhibisi pada setiap konsentrasi ekstrak dan IC_{50} pada setiap ekstrak.

d. Pengujian Kontrol Sampel Ekstrak (S_0)

Larutan sampel ekstrak sebanyak 1-40 μ l ditambah dengan 20-64 μ L dapar fosfat pH 6,8. Total campuran ekstrak dan dapar fosfat ini adalah 65 μ L dengan jumlah masing-masing bervariasi disesuaikan dengan konsentrasi akhir yang diinginkan. Kemudian ditambahkan 10 μ L p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG), lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Selanjutnya ditambah 100 μ L Na_2CO_3 0,2 M untuk memberikan suasana basa agar reaksi enzimatik tidak berjalan, sampel diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 25 μ L enzim 0,05 U/ml. Larutan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

e. Pengujian Pembandingan Akarbose

Larutan akarbose sebanyak 1-40 μ l ditambah dengan 20-64 μ L dapar fosfat pH 6,8. Total campuran akarbose dan dapar fosfat ini adalah 65 μ L dengan jumlah masing-masing bervariasi disesuaikan dengan konsentrasi akhir yang diinginkan. Kemudian ditambahkan 10 μ l p-nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNPG) dan 2 μ l larutan akarbose diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 25 μ l larutan enzim 0,05 U/ml. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah masa inkubasi selesai, segera ditambahkan 100 μ L Na_2CO_3 0,2 M untuk menghentikan reaksi enzimatik. Larutan diukur serapannya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm. Hitung nilai % inhibisi pada setiap konsentrasi akarbose dan nilai IC_{50} akarbose.

f. Pengujian Kontrol Pembanding Akarbose

Larutan akarbose sebanyak 1-40 μL ditambah dengan 20-64 μL dapar fosfat pH 6,8. Total campuran akarbose dan dapar fosfat ini adalah 65 μL dengan jumlah masing-masing bervariasi disesuaikan dengan konsentrasi akhir yang diinginkan. Kemudian ditambahkan 10 μL p-nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNPG) dan 2 μL larutan akarbose diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 100 μL Na_2CO_3 0,2 M untuk memberikan suasana basa agar reaksi enzimatik tidak berjalan. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah masa inkubasi selesai, segera ditambahkan 25 μL larutan enzim 0,05 U/ml. Larutan diukur serapannya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

Berikut ini tabel yang menjelaskan penambahan reagen selama uji.

Tabel 3.2 . Skema penambahan reagen uji penghambatan α -glukosidase (Basuki, et al., 2002)

Reagen	Volume (μL)			
	Tanpa Inhibitor		Dengan Inhibitor	
	C_0	C_1	S_1	S_0
Inhibitor	-	-	1-40	1-40
DMSO	2	2	-	-
Dapar	63	63	20-64	20-64
Substrat	10	10	10	10
Inkubasi pada suhu 37°C, selama 5 menit				
Enzim	-	25	25	-
Na_2CO_3	100	-	-	100
Inkubasi pada suhu 37°C, selama 30 menit				
Enzim	25	-	-	25
Na_2CO_3	-	100	100	-
Ukur serapan dengan <i>Microplate Reader</i> pada $\lambda = 405 \text{ nm}$				

Keterangan: C_1 = blanko negatif; C_0 = kontrol blanko; S_1 = sampel ekstrak atau pembanding akarbose; S_0 = kontrol sampel ekstrak atau pembanding akarbose

g. Penafsiran Data Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase

Pada setiap pengukuran penghambatan α -glukosidase, pengukuran dilakukan dua kali (duplo). Persen penghambatan diukur dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(C-S)}{C} \times 100 \% \quad (3.5)$$

Dimana S adalah serapan S_1-S_0 , dan C adalah serapan C_1-C_0 .

Konsentrasi hambat 50% (IC_{50}) dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier, di mana sumbu x adalah konsentrasi sampel dan persentase inhibisi adalah sumbu y. Dari persamaan $y = a + bx$ didapat IC_{50} dengan menggunakan rumus :

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b} \quad (3.6)$$

3.4.5 Uji Kinetika Penghambatan Enzim

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

Larutan fraksi sebanyak 1-40 μ l ditambah dengan 20-64 μ L dapar fosfat pH 6,8. Total campuran fraksi dan dapar fosfat ini adalah 65 μ L dengan jumlah masing-masing bervariasi disesuaikan dengan konsentrasi akhir yang diinginkan. Kemudian ditambahkan 10 μ L larutan substrat p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNP-G) dengan 4 konsentrasi berbeda, konsentrasi PNP-G yang digunakan yaitu 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, dan 20 mM. Kemudian larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Lalu ditambahkan 25 μ L larutan enzim dengan konsentrasi 0,05 U/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C

selama 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 100 μL Na_2CO_3 200 mM. Larutan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada λ 405 nm.

Jenis penghambatan kompetitif atau nonkompetitif dapat ditentukan dengan analisis data menggunakan *Lineweaver-Burke* untuk mendapatkan tetapan kinetika *Michaelis-Menten* yang dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = a + bx$, di mana $\frac{1}{[S]}$ sebagai sumbu x dan $\frac{1}{v_o}$ sebagai sumbu y, sehingga akan diperoleh tetapan *Michaelis-Menten* (Murray, Granner, & Rodwell, 2009) sebagai berikut:

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

$$y = 0 \quad \rightarrow \quad x = - \frac{1}{K_m}$$

$$y = a + b \left(- \frac{1}{K_m} \right)$$

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

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

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

Tabel 3.3 Prosedur Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim (Basuki, et al., 2002).

Reagen	Volume (μL)	
	Tanpa Inhibitor	Dengan Inhibitor
Ekstrak	-	2
DMSO	2	-
Dapar	63	63
Substrat	10	10
Inkubasi penangas air 37°C selama 15 menit		
Enzim	25	25
Inkubasi penangas air 37°C selama 30 menit		
Na_2CO_3	100	100
Ukur absorbansi dengan <i>Microplate Reader</i> pada $\lambda = 405 \text{ nm}$		

3.4.6 Pola Kromatogram dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi Aktif

3.4.6.1 Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak yang memiliki aktivitas terbesar (fraksi aktif) ditimbang, kemudian dibuat sebagai larutan uji yang akan dianalisis secara kualitatif dengan kromatografi lapis tipis.

Umumnya dibuat kromatogram pada lempeng silika gel dengan berbagai jenis fase gerak sesuai dengan golongan kandungan kimia sebagai sasaran analisis. Evaluasi dapat dilakukan dengan dokumentasi foto hasil pewarnaan lempeng kromatografi dengan pereaksi yang sesuai.

3.4.6.2 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia

a. Identifikasi alkaloid (*Materia Medika*, 1995 dan Farnsworth, 1966)

Ekstrak ditimbang dan ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air, panaskan di penangas air selama 2 menit, dinginkan. Kemudian saring dan tampung filtrat (filtrat a). Filtrat a digunakan sebagai larutan percobaan selanjutnya.

- i. Ambil 1 mL filtrat a, masukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 2 tetes Pereaksi Mayer, terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol (positif alkaloid).
- ii. Ambil 1 mL filtrat a, masukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 2 tetes Pereaksi Dragendorff, terbentuk endapan jingga coklat (positif alkaloid).

Uji kualitatif secara KLT (Wagner, Zgainski, & Bladt, 1984) :

Larutan percobaan ditotolkan pada pelat silika gel dalam kloroform : metanol (85 : 15). Deteksi adanya alkaloid mula-mula di bawah sinar UV 254-366nm. Untuk lebih memastikan, semprot lempeng dengan menggunakan pereaksi Dragendorff dan akan terlihat bercak jingga jika positif mengandung alkaloid.

b. Identifikasi flavonoid (Wagner, Zgainski, & Bladt, 1984) :

Larutan percobaan ditotolkan pada pelat silika gel dengan memakai pengembang butanol : asam asetat : air (4: 1: 5). Semprot dengan larutan penampak noda $AlCl_3$ dalam kloroform, noda warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

c. Identifikasi terpen (Wagner, Zgainski, & Bladt, 1984)

Totolkan ekstrak yang sudah dipisahkan pada lempeng silika gel G_{F254} dengan memakai pengembang benzen-etil asetat (90 : 10). Deteksi adanya

terpen berupa bercak gelap di bawah sinar UV 254 nm, kemudian semprot menggunakan larutan vanillin- H_2SO_4 . Amati di bawah sinar tampak.

d. Identifikasi tanin (Farnsworth, 1966)

Ekstrak ditimbang dan ditambahkan 15 mL air panas. Kemudian panaskan hingga mendidih selama 5 menit. Saring filtrat (filtrat c)

- i. Ditambahkan beberapa tetes $FeCl_3$ 1 % menghasilkan warna hijau violet.
- ii. Ditambahkan beberapa tetes gelatin membentuk endapan putih.
- iii. Dijenuhkan dengan Na asetat ditambah $FeCl_3$ 1% menghasilkan warna biru tinta atau hitam, menunjukkan adanya tanin galat.

Uji kualitatif secara KLT (Wagner, Zgainski, & Bladt, 1984) :

Larutan percobaan ditotolkan pada pelat silika gel dalam butanol: asam asetat anhidrat: air (4:1:5). Kemudian disemprotkan dengan pereaksi $FeCl_3$ dan dilihat bercak yang timbul setelah penyemprotan. Deteksi adanya tanin mula-mula di bawah sinar tampak.

e. Identifikasi saponin (Wagner, Zgainski, & Bladt, 1984)

Kromatografi pada lempeng silika gel dengan memakai pengembang kloroform-metanol-air (40:50:10). Kemudian disemprotkan pereaksi semprot campuran anisaldehyd dan asam sulfat dan akan membentuk warna biru keunguan dan terkadang timbul warna kuning.

f. Identifikasi glikosida (*Materia Medika*, 1995)

Beberapa mg ekstrak ditambahkan 20 mL etanol 70%, kemudian tambahkan 25 mL air dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4M, kocok, diamkan selama 5 menit dan saring. Sari filtrat tiga kali, tiap kali dengan 20 mL campuran (3:1) kloroform P dan isopropanol. Kumpulan sari tambahkan

Universitas Indonesia

natrium sulfat anhidrat, saring dan uapkan pada suhu tidak lebih dari 50°. Larutkan sisa dengan 2 mL metanol.

i. Larutan percobaan sebanyak 1 mL diuapkan hingga kering, sisanya ditambahkan 20 tetes asam asetat anhidrat P dan 1 tetes asam sulfat P. Hasil positif terbentuknya warna biru / hijau.

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

g. Identifikasi kuinon dan antrakuinon (Wagner, Zgainski, & Blatt, 1984)

Totolkan ekstrak yang sudah dipekatkan pada pelat silika gel dengan memakai fase gerak campuran butanol:asam asetat:air (40:10:50). Larutan penampak noda yang dipakai KOH 10% dalam metanol, warna yang semula kuning dan coklat kuning berubah menjadi merah, ungu, hijau atau lembayung.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Simplisia

Serbuk simplisia kering sebanyak 2 kg diekstraksi dengan cara panas. Cara panas yang dilakukan yaitu refluks bertingkat menggunakan pelarut yang ditingkatkan kepolarannya berturut-turut dari pelarut nonpolar hingga pelarut polar yaitu n-heksana, etil asetat dan metanol selama 30 menit dalam labu refluks setinggi 3-5 cm diatas serbuk simplisia.

Cara refluks dipilih karena karena metode ini relatif cepat dan merupakan salah satu metode yang sudah biasa digunakan untuk ekstrak yang akan diuji efek penghambatannya terhadap aktivitas α -glukosidase selain dari metode maserasi, sokhlet dan perkolasi.

Heksana dipilih karena sifat non-polar nya yang tinggi sehingga dapat menyari klorofil dan zat-zat non polar lainnya. Etil asetat dipilih karena berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya fraksi pada pelarut ini memiliki aktivitas penghambatan enzim α -Glukosidase paling besar selain itu pelarut ini dapat menyari kandungan flavonoid pada daun yang memiliki kemampuan menghambat aktivitas enzim α -Glukosidase (Lee & Lee, 2001; Sugiwati, Setiasih, & Afifah, 2009). Metanol dipilih karena metanol memiliki kemampuan ekstraksi yang tinggi untuk hampir semua senyawa bahan alam yang memiliki berat molekul rendah, seperti alkaloid, saponin, dan flavonoid. Selain itu, sifat metanol yang polar diharapkan dapat menyari kandungan senyawa polar dalam simplisia yang memiliki sifat serupa dengan substrat enzim α -Glukosidase yaitu p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) yang juga bersifat polar.

Masing-masing ekstrak kemudian diuapkan dengan rotary vacuum evaporator hingga diperoleh ekstrak kental dari masing-masing pelarut kemudian ditimbang. Hasil ekstraksi dan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.1 Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (Depkes RI, 2000).

4.2 Fraksinasi

Metode fraksinasi yang digunakan adalah kromatografi kolom dengan fase diam silika dan fase gerak heksana dan etil asetat kemudian diikuti dengan campuran etil asetat-metanol. Fase gerak tersebut dipilih karena pada uji pemilihan eluen dengan metode KLT didapatkan pemisahan komponen senyawa yang baik yang dilihat dari spot yang terlihat jelas dan berjuahan. Pemisahan yang baik ini mungkin dikarenakan berada pada rentang polaritas yang diinginkan dan dapat mewakili sifat polar dan nonpolar dari senyawa sehingga diharapkan dapat memisahkan dengan baik senyawa berdasarkan polaritasnya.

4.2.1 Pengemasan kolom

Silika gel 60 disiapkan cara basah disuspensikan dalam heksana 100% dan dituang ke dalam kolom gelas (5,5 x 60 cm) yang sebelumnya telah diberikan penyumbat kapas. Kolom gelas diketuk-ketuk untuk menghilangkan gelembung udara dan dialirkan fase gerak selama beberapa saat untuk membuat suspensi silika padat dan rapat. Ketinggian silika mencapai 75% dari tinggi kolom gelas.

Silika gel dipilih karena memiliki polaritas yang sesuai dengan ekstrak etil asetat yang dielusikan. Cara basah dipilih karena metode ini memungkinkan pembasahan silika yang lebih merata dan kolom yang dihasilkan juga akan memiliki kerapatan yang lebih baik.

4.2.2 Penyiapan sampel

Sebanyak 35 mg ekstrak kental etil asetat daun jambu mete ditimbang dan dilarutkan dalam aseton. Setelah larut sempurna kemudian ditambah sejumlah silika gel 60 kedalam larutan dan diaduk. Campuran dikeringkan hingga seluruh aseton menguap dan diperoleh campuran kering ekstrak dengan dengan silika.

4.2.3 Elusi

Fase gerak terpilih dialirkan hingga sekitar 1mm di atas fase diam dan sampel kering diletakan di atasnya dan fase gerak terpilih ditambahkan kembali diatas ekstrak kering. Untuk mempertahankan fase diam tetap berada dalam keadaan terendam dalam fase gerak, fase gerak ditambahkan diatas ekstrak kering perlahan dan dipertahankan selalu basah oleh fase gerak. Selama elusi berjalan keran dibuka dengan kecepatan 40 tetes tiap menit.

Pada awal elusi, pita hitam mulai turun dan seiring dengan kenaikan polaritas perlahan dengan etil asetat sebanyak 1% tiap 400 ml, pita berwarna kuning mulai terlihat memisah dan semakin turun dengan penambahan fase gerak yang sama. Pada elusi tahap lanjut dimana presentase etil asetat mulai bertambah tinggi, pita warna hitam, abu-abu, kecoklatan, hijau dan kekuningan mulai terlihat yang menunjukkan terjadinya pemisahan komponen senyawa didalamnya.

Setiap fraksi hasil elusi kromatografi kolom yang keluar ditampung ke dalam vial dengan volume yang sama tiap tampungannya.

4.2.4 Penggabungan Fraksi

Dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis dengan eluen yang diketahui memiliki pemisahan paling baik pada tahap pemilihan eluen, dalam hal ini n-heksan-etil asetat (70:30), pada tiap 5 fraksi yang terkumpul dan dilakukan penggabungan fraksi berdasarkan profil KLT yang didapat. Fraksi

yang memiliki profil KLT serupa disatukan karena profil yang sama ini menunjukkan komponen senyawa yang terkandung dalam fraksi tersebut adalah sama.

Penyatuan ini dilakukan dengan maksud mengefisienkan fraksi yang diujikan dan agar masing-masing fraksi yang diuji efek penghambatannya terhadap enzim α -glukosidase memiliki komponen yang berbeda sehingga efek penghambatannya pun berbeda dan dapat saling dibandingkan. Dari tahap ini didapat 6 fraksi dari ekstrak etil asetat yang akan dilakukan uji efek penghambatan terhadap aktivitas enzim α -glukosidase. Data berat masing-masing fraksi yang diujikan dapat dilihat pada tabel 4.2

4.3 Uji Pendahuluan Enzim

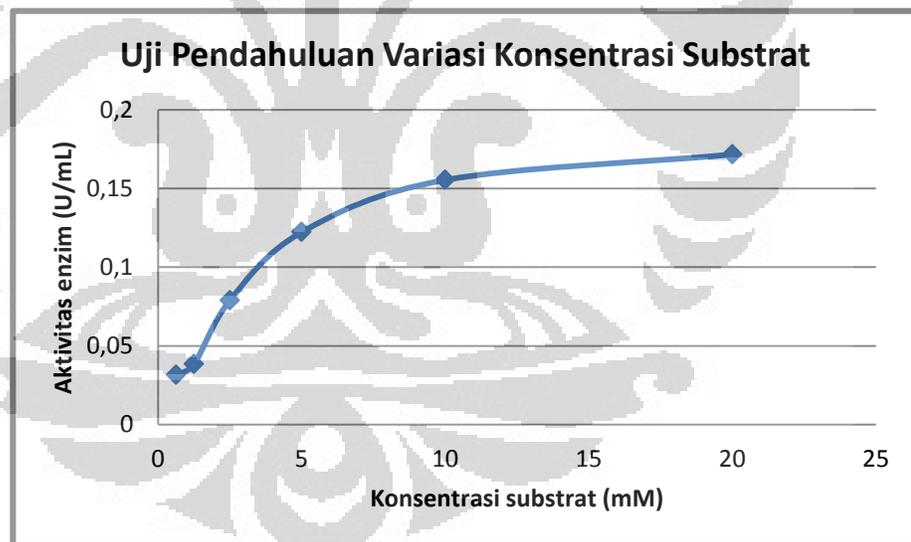
4.3.1 Uji Pendahuluan Variasi Konsentrasi Substrat

Pertama dilakukan uji pendahuluan untuk mengetahui konsentrasi substrat yang optimum untuk pengujian aktivitas enzim. Unit enzim yang digunakan pada uji optimasi ini adalah 0,05 U/mL. Enzim yang digunakan sebesar 5,0 mg dengan spesifikasi 15,2 mg solid enzim mengandung 23% protein dan terdapat 215 unit enzim tiap mg protein.

Pengujian aktivitas enzim dilakukan dengan cara mencampurkan DMSO, substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida konsentrasi 20 mM; 10 mM; 5 mM; 2,5 mM; 1,25 mM; dan 0,625 mM dan dapar fosfat (pH 6,8) diinkubasi pada 37°C selama 5 menit, kemudian ditambahkan larutan enzim α -glukosidase 0,05 U/mL dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Peningkatan konsentrasi substrat ini dimaksudkan untuk mengetahui pada konsentrasi berapa semua sisi aktif enzim terikat oleh substrat dan tidak lagi akan menghasilkan produk ketika konsentrasi substrat dinaikkan atau dikatakan dalam keadaan jenuh. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan natrium karbonat (Kikkoman, 2001) karena pada suasana basa reaksi enzimatik akan terhenti.

Produk yang dihasilkan dari reaksi antara α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang memberikan absorbansi maksimum sekitar 405 nm. Untuk mengoreksi hasil serapan blanko (kontrol), pengamatan dilakukan terhadap aktivitas enzim dengan menukar posisi antara enzim α -glukosidase dan natrium karbonat. Pada kontrol, natrium karbonat ditambahkan setelah inkubasi selama 5 menit substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida dan dapar fosfat (pH 6,8). Setelah diinkubasi selama 30 menit, ditambahkan α -glukosidase pada campuran reaksi tersebut.

Hasil yang diperoleh dari kontrol dapat digunakan untuk melihat apakah masih ada produk yang terbentuk pada reaksi antara p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida dan α -glukosidase saat kondisi campuran telah dibasakan terlebih dahulu dengan natrium karbonat.



Gambar 4.1 Grafik Hasil Uji Pendahuluan Variasi Konsentrasi Substrat

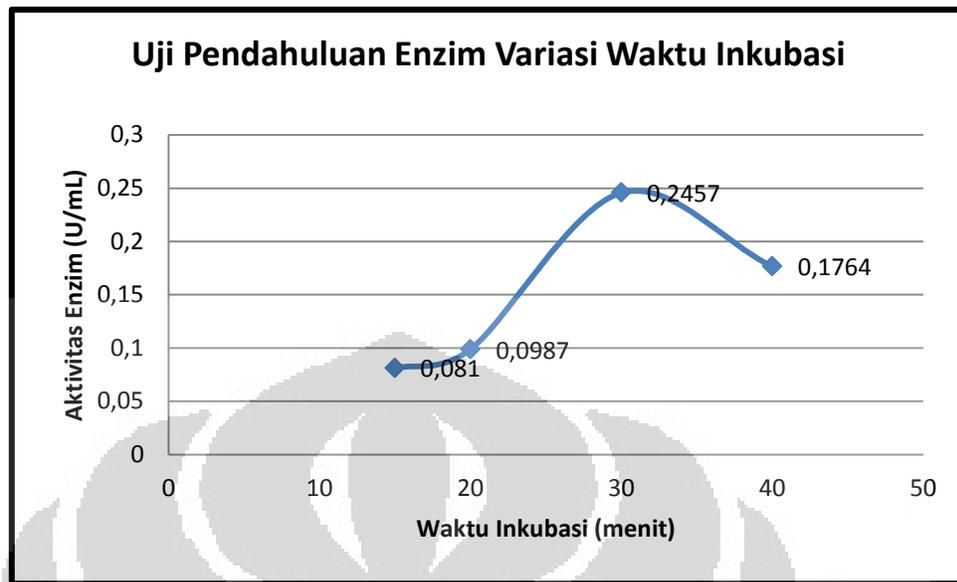
Gambar 4.1 menunjukkan bahwa pada konsentrasi substrat 0,625 mM hingga 10 mM masih menunjukkan absorbansi yang terus meningkat. Hal ini

menunjukkan pada rentang konsentrasi tersebut sisi aktif belum seluruhnya terikat, sehingga pada konsentrasi substrat yang terus ditingkatkan enzim masih dapat menghasilkan produk.

Aktivitas yang stabil didapatkan pada konsentrasi substrat 10 mM dan 20 mM. Hal ini menunjukkan pada konsentrasi substrat ini sisi aktif enzim mungkin telah terisi penuh oleh substrat sehingga pada peningkatan konsentrasi substrat lebih lanjut tidak akan mempengaruhi absorbansi yang menandakan tidak ada lagi produk yang dihasilkan. Pada penelitian kali ini dipakai konsentrasi substrat 10 mM sebagai konsentrasi substrat optimum yang akan digunakan pada uji penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase. Data serapan dapat dilihat pada Tabel 4.4. Pengujian aktivitas enzim menunjukkan bahwa larutan enzim aktivitas yang optimum pada konsentrasi substrat 10 mM. Hasil ini serupa dengan literatur yang menyebutkan konsentrasi substrat yang baik digunakan pada pengujian aktivitas enzim ini adalah 10 mM (Sigma Aldrich USA, 1996).

4.3.2 Uji Pendahuluan Variasi Waktu Inkubasi

Uji pendahuluan kedua dilakukan untuk mengetahui waktu inkubasi optimum yang diperlukan untuk mendapatkan aktivitas enzim paling baik. Dalam uji ini dilakukan selama waktu tertentu (15; 20; 30 dan 40 menit). Proses inkubasi terdiri dari dua tahap. Pada tahap pertama, inkubasi selama 5 menit bertujuan untuk memberikan waktu bagi larutan uji untuk mencapai suhu 37°C dimana reaksi enzimatik dapat berjalan dengan baik. Sedangkan pada tahap kedua, inkubasi selama (15; 20; 30; dan 40 menit) merupakan waktu inkubasi berlangsungnya reaksi enzimatik.



Gambar 4.2 Grafik Hasil Uji Pendahuluan Variasi Waktu Inkubasi

Dari gambar 4.2 Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa waktu inkubasi 30 menit merupakan waktu inkubasi yang paling optimum, dan diharapkan pada waktu inkubasi yang paling singkat didapatkan aktivitas enzim yang paling baik. (lihat Tabel 4.3).

Pengujian aktivitas enzim menunjukkan bahwa larutan enzim aktivitas yang optimum dengan waktu inkubasi 30 menit. Hal ini sedikit berbeda dengan literatur yang menyebutkan waktu inkubasi dilakukan selama 20 menit (Sigma Aldrich USA, 1996). Perbedaan ini mungkin dikarenakan perbedaan kondisi inkubasi pada tempat produsen dan tempat uji yang dilakukan peneliti. Namun waktu 30 menit akhirnya dipilih dengan pertimbangan waktu inkubasi 20 menit terbukti menunjukkan aktivitas yang belum optimal berdasarkan uji pendahuluan.

4.4 Uji efek penghambatan aktivitas α -glukosidase

Pengujian penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase diukur berdasarkan hasil absorbansi *p*-nitrofenol yang merupakan produk dari reaksi

enzim α -glukosidase dengan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG).

Absorbansi diukur dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm. Nilai absorbansi akan menurun jika sampel memiliki daya hambat terhadap aktivitas enzim α -glukosidase.

Pada pengujian ini digunakan variasi konsentrasi ekstrak. Pengujian pada konsentrasi ekstrak yang bervariasi ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan konsentrasi ekstrak terhadap daya inhibisi enzim. Variasi konsentrasi ekstrak etil asetat yang digunakan adalah 200; 150; 75; 50 dan 25 $\mu\text{g/mL}$. Dari variasi konsentrasi ekstrak tersebut didapat hasil yang menunjukkan pada konsentrasi ekstrak yang tinggi, daya hambat terhadap enzim α -glukosidase juga tinggi. Kemudian didapat persamaan regresi linier dari variasi konsentrasi ekstrak yang dilakukan. Dari persamaan ini didapat nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} adalah konsentrasi yang dibutuhkan oleh inhibitor (ekstrak) untuk menginhibisi sebanyak 50% dari aktivitas enzim α -glukosidase. Dari definisi ini dapat dikatakan bahwa semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin baik daya inhibisi terhadap enzim.

Pada pengujian ini juga dilakukan pengamatan aktivitas enzim tanpa penggunaan ekstrak (blanko) untuk melihat pengaruh penghambatan ekstrak tersebut terhadap aktivitas enzim. Sebagai koreksi untuk mengetahui apakah reaksi enzimatik telah berhenti seluruhnya dilakukan juga uji kontrol terhadap sampel dan kontrol terhadap blanko.

Sebagai kontrol positif digunakan akarbose dengan konsentrasi 200; 150; 100; 75; 50 dan 25 ppm. Dari hasil pengujian, akarbose memiliki efek penghambatan enzim dengan nilai IC_{50} 255,39 ppm. Sebagai perbandingan antar ekstrak, uji efek penghambatan enzim α -glukosidase dilakukan terhadap tiga ekstrak daun jambu mete yang memiliki polaritas pelarut yang berbeda. Uji pertama dilakukan terhadap ekstrak heksana, kemudian ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol daun jambu mete.

Tabel 4.5 Hasil Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Inhibitor	IC ₅₀ (μ g/mL)
Ekstrak n-Heksana	56,17
Ekstrak Etil Asetat	43,66
Ekstrak Metanol	54,69
Akarbose	255,39

Jika dibandingkan dengan kontrol positif akarbose, nilai IC₅₀ ketiga ekstrak jauh lebih kecil yang menandakan efek penghambatan terhadap aktivitas enzim α -glukosidase yang lebih besar. Hal ini mungkin dikarenakan ekstrak merupakan campuran dari senyawa-senyawa yang belum murni sehingga komponen senyawa di dalamnya dapat bersifat sinergis dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Selain itu nilai IC₅₀ akarbose yang didapat dari penelitian relative jauh dari nilai IC₅₀ akarbose yang didapat dari literatur yaitu 128 ppm (Andrade, Becerra, & Cardenas, 2008).

Perbedaan nilai ini mungkin dikarenakan akarbose dinilai kurang efektif dalam menghambat aktivitas α -glukosidase yang berasal dari mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* yang dipakai pada pengujian kali ini, akarbose lebih efektif dalam menghambat aktivitas α -glukosidase yang berasal dari mamalia seperti sukrase dan maltase. (Kim, et al., 2008; Shinde, et al., 2008).

Selain itu, perbedaan nilai IC₅₀ mungkin juga disebabkan oleh perbedaan reagen yang ditambahkan kedalam campuran uji sehingga mempengaruhi kondisi reaksi enzimatik yang terjadi. Perbedaan metode pengukuran absorbansi yang digunakan pada uji ini juga dapat mempengaruhi nilai IC₅₀ akarbose sehingga tidak sama dengan literature. Hasil uji ekstrak etil asetat dapat dilihat pada tabel 4.5

Setelah dilakukan uji pada masing-masing ekstrak, kemudian dipilihlah salah satu ekstrak dengan aktivitas yang paling baik untuk

kemudian dilakukan fraksinasi dan diuji efek penghambatan masing-masing fraksinya. Ekstrak yang akan diuji fraksinya adalah ekstrak etil asetat yang memiliki aktivitas penghambatan tertinggi disbanding ekstrak lainnya. Hasil uji ekstrak etil asetat dapat dilihat pada tabel 4.8.

Ekstrak etil asetat kemudian difraksinasi dan didapatlah 6 fraksi uji. Keenam fraksi yang akan diuji kemudian dilihat terlebih dahulu % inhibisinya pada satu konsentrasi yang sama yaitu 100 $\mu\text{g/mL}$ dan didapat hasil inhibisi yang relative berbeda pada masing-masing fraksi. Setelah % inhibisi pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ didapat barulah ditentukan 5 titik konsentrasi yang dipakai masing-masing fraksi untuk mengetahui nilai IC_{50} .

Tabel 4.10 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Fraksi dari Ekstrak Etil Asetat

Fraksi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
A	63,36
B	119,15
C	82,89
D	57,79
E	63,77
F	28,76

Dari tabel 4.2 dapat dilihat bahwa fraksi F memiliki nilai IC_{50} terendah yang menandakan fraksi ini memiliki efek penghambatan yang paling besar diantara enam fraksi yang diuji. Hasil uji fraksi F dapat dilihat pada Tabel 4.8.

Jika dibandingkan dengan nilai IC_{50} ekstrak, nilai IC_{50} fraksi ada yang lebih tinggi dan lebih rendah dari ekstrak. Hal ini mungkin dikarenakan pada larutan ekstrak belum mengalami fraksinasi sehingga kandungannya masih belum murni dan senyawa-senyawa masih bekerja secara sinergis dalam menghambat enzim α -glukosidase sehingga nilai IC_{50} rendah. Fraksi A sampai E lebih besar dibanding ekstrak. Sementara Fraksi F memiliki nilai IC_{50} yang

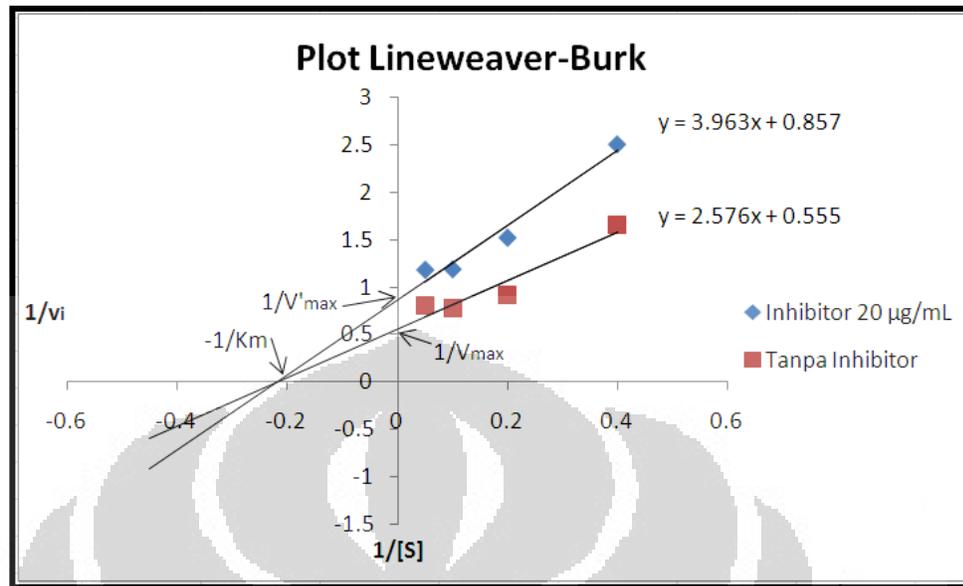
lebih kecil dari ekstrak, hal ini menandakan bahwa efek penghambatan fraksi ini lebih tinggi daripada ekstrak. Hal ini mungkin dikarenakan eluen yang digunakan saat mengkromatografi fraksi A-E ini polaritasnya masih rendah sehingga senyawa yang tertarik juga memiliki polaritas yang rendah, sementara pada fraksi F fase gerak yang digunakan sudah memiliki polaritas yang tinggi sehingga dapat menarik senyawa-senyawa polar yang memiliki efek penghambatan baik.

4.5 Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Uji kinetika enzim dilakukan untuk mengetahui jenis penghambatan yang dilakukan oleh sampel sebagai inhibitor terhadap enzim. Untuk menganalisis kinetika enzim, dapat digunakan plot Lineweaver-Burk, dimana sumbu x adalah satu per konsentrasi substrat ($1/S$) sedangkan sumbu y adalah satu per kecepatan reaksi enzim ($1/V$). Kinetika enzim dapat diketahui dengan melihat aktivitasnya terhadap kenaikan konsentrasi substrat, dimana konsentrasi yang digunakan adalah 2,5 mM; 5 mM; 10 mM; dan 20 mM.

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

Penghambat yang dipilih adalah fraksi F dari ekstrak etil asetat. Hal ini didasarkan pada nilai IC_{50} yang paling kecil diantara ekstrak dan fraksi lain yang diujikan atau dengan kata lain fraksi ini merupakan fraksi yang paling kuat efek penghambatannya terhadap aktivitas enzim α -glukosidase dibandingkan fraksi uji lain. Konsentrasi fraksi F etil asetat yang digunakan adalah 20 $\mu\text{g/mL}$. Konsentrasi ini diambil untuk mendekati nilai IC_{50} fraksi. Data hasil uji kinetika penghambatan aktivitas enzim dapat dilihat pada Tabel 4.9.



Gambar 4.3 Plot Lineweaver-Burk Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase pada Fraksi F Ekstrak Etil Asetat Daun Jambu Mete 20 $\mu\text{g/mL}$

Berdasarkan hasil plot Lineweaver-Burk, saat $1/[S]$ mendekati 0, kecepatan maksimum reaksi (V_{\max}) kondisi tanpa inhibitor tidak sama seperti pada keadaan dengan inhibitor. Hal ini menunjukkan bahwa inhibitor masih dapat mempengaruhi aktivitas enzim meskipun enzim sudah berikatan seluruhnya dengan substrat yang menandakan inhibitor tidak menghambat substrat secara kompetitif (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).

Berdasarkan persamaan yang diperoleh, nilai V_{\max} dan K_m dapat ditentukan. Pada sistem tanpa inhibitor diperoleh persamaan $y = 0,555 + 2.576x$ dengan nilai V_{\max} 1,8018 $\mu\text{mol/mL}$ menit dan nilai K_m 4,6414 $\mu\text{mol/mL}$. Sedangkan pada sistem dengan inhibitor 20 $\mu\text{g/mL}$ diperoleh persamaan $y = 0,857 + 3,693x$ dengan nilai V_{\max} 1,1668 $\mu\text{mol/mL}$ menit dan nilai K_m 4,6242 $\mu\text{mol/mL}$. Hasil ini menunjukkan bahwa K_m pada sistem dengan inhibitor sama dengan atau mendekati K_m dengan sistem dengan inhibitor. Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten dapat dilihat pada Tabel 4.10.

Hasil plot menunjukkan bahwa fraksi F etil asetat daun jambu mete konsentrasi 20 ppm memiliki mekanisme penghambatan non-kompetitif. Pernyataan tersebut dapat dilihat dari hasil plot Lineweaver-Burk antara sistem tanpa inhibitor dengan sistem dengan inhibitor $\mu\text{g/mL}$ yang menunjukkan adanya perpotongan kedua persamaan garis di sumbu x. Inhibitor yang memiliki mekanisme penghambatan non-kompetitif memiliki tempat ikatan pada enzim yang berbeda dengan substrat sehingga tidak terdapat persaingan pada sisi aktif enzim (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).

4.6 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia

Fraksi teraktif dari ekstrak etil asetat diidentifikasi secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang tertarik dengan pelarut etil asetat, sehingga dapat diduga golongan senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap α -glukosidase pada ekstrak yang diperoleh. Golongan senyawa kimia yang diidentifikasi dapat dilihat pada Tabel 4.4

Tabel 4.4 Hasil Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi F Ekstrak Etil Asetat

	Fraksi F
Alkaloid	(-)
Flavonoid	(+)
Terpen	(-)
Tanin	(+)
Saponin	(+)
Glikosida	(+)
Antrakuinon	(+)

4.6.1 Flavonoid

Identifikasi dilakukan dengan mengeluskan fraksi pada lempeng KLT dengan fase gerak campuran butanol:asam asetat:air (4:1:5) untuk memisahkan senyawa flavonoid dan komponen lain dalam fraksi uji. Setelah terelusi kemudian disemprotkan dengan pereaksi semprot AlCl_3 10% secukupnya dan dilihat fluoresensi dibawah sinar UV dengan $\lambda = 366\text{nm}$. Fluoresensi ekstrak dibandingkan dengan standar quersetin. Ekstrak mengandung flavonoid apabila menghasilkan fluoresensi hijau kuning (Harborne, 1987).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa fraksi uji positif mengandung flavonoid dengan fluoresensi kuning. Hasil ini serupa dengan literatur yang menyebutkan ekstrak etanol daun jambu mete mengandung flavonid tidak kurang dari 2,30% dihitung sebagai kuersetin (BPOM RI, 2004).

Senyawa golongan flavonoid memang terbukti memiliki efek hipoglikemik melalui mekanisme penghambatan aktivitas α -glukosidase (Pereira, et al., 2011). Beberapa jenis senyawa golongan flavonoid yang sudah ditemukan sebelumnya dan diketahui memiliki efek penghambatan aktivitas α -glukosidase antara lain 3-O-galaktosida, 3-O-glukosida, 3-O-xylopiranosida, 3-O-arabinopyranoside, 3-O-arabinofuranosida dan 3-O-ramnosida dari mirisetin and kuersetin (de Brito, et al., 2007). Golongan flavonoid lain yang juga diketahui memiliki efek penghambatan aktivitas α -glukosidase adalah genistein, senyawa isoflavon yang didapat dari hasil fermentasi *Streptomyces sp* (Lee & Lee, 2001).

4.6.2 Tanin

Uji dilakukan dengan mengelusi larutan fraksi uji dengan fase gerak campuran butanol: asam asetat anhidrat: air (4:1:5) untuk memisahkan senyawa tanin dengan komponen lainnya dalam fraksi uji. Setelah terelusi

kemudian disemprotkan dengan pereaksi FeCl_3 dan dilihat bercak yang timbul setelah penyemprotan. Hasil positif jika terlihat warna kehitaman pada bercak setelah disemprotkan. Hasil uji menunjukkan bahwa fraksi uji positif mengandung tannin yang ditunjukkan oleh warna hitam yang timbul serupa dengan blanko.

4.6.3 Saponin

Berdasarkan hasil identifikasi, saponin terkandung pada fraksi uji. Buih yang terbentuk sedikit, namun buih tersebut tidak hilang setelah penambahan HCl 2N dan stabil dalam waktu lebih dari 10 menit sehingga disimpulkan hasil positif terhadap saponin.

Selain itu juga dilakukan uji lain dengan mengelusi larutan fraksi uji pada fase gerak campuran butanol: asam asetat anhidrat: air (4:5:1). Setelah terelusi kemudian plat KLT disemprotkan dengan larutan anisaldehyd dan dipanaskan. Hasil positif jika setelah dipanaskan terbentuk bercak warna ungu seperti pada blanko. Hasil uji menunjukkan bahwa fraksi uji positif mengandung saponin yang ditunjukkan oleh bercak ungu yang terbentuk.

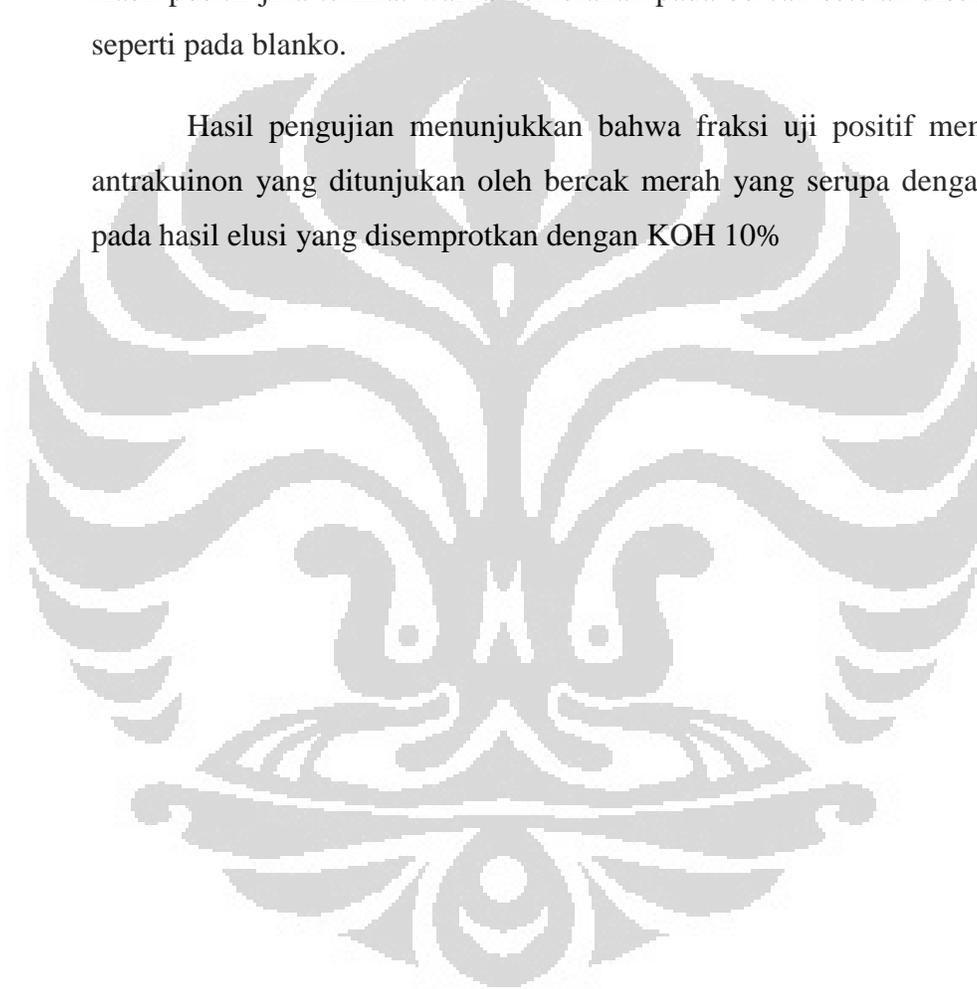
4.6.4 Glikosida

Pada proses identifikasi, gula hasil hidrolisis dapat diidentifikasi dengan tes Mollisch. Hidrolisis dapat dilakukan pemanasan dengan larutan asam yaitu HCl 2N. Maka pada proses identifikasi, ekstrak dipanaskan selama 10 menit dalam 5 mL HCl 2N. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin ungu setelah diberikan asam sulfat pekat. Berdasarkan hasil identifikasi, fraksi uji positif mengandung glikosida yang ditunjukkan oleh terbentuknya cincin berwarna ungu kecoklatan setelah diberikan asam sulfat pekat.

4.6.5 Antrakuinon

Antrakuinon di alam kemungkinan dalam bentuk bebas, glikosida, atau antron (bentuk tereduksi). Untuk mengidentifikasi antrakuinon, dilakukan elusi pada fase gerak campuran butanol: asam asetat anhidrat: air (4:1:5) dan hasil elusi kemudian disemprotkan dengan pereaksi KOH 10%. Hasil positif jika terlihat warna kemerahan pada bercak setelah disemprotkan seperti pada blanko.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa fraksi uji positif mengandung antrakuinon yang ditunjukkan oleh bercak merah yang serupa dengan blanko pada hasil elusi yang disemprotkan dengan KOH 10%



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

- 5.1.1 Ekstrak yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase tertinggi adalah ekstrak etil asetat daun jambu mete dengan nilai IC_{50} 43,66 ppm dengan mekanisme penghambatan non-kompetitif.
- 5.1.2 Fraksi paling aktif dari enam fraksi yang diuji adalah fraksi keenam yaitu fraksi F dengan IC_{50} 28,76 ppm
- 5.1.3 Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa fraksi paling aktif ekstrak etil asetat daun jambu mete mengandung flavonoid, glikosida, tannin, antrakuinon dan saponin.

5.2. Saran

Hendaknya dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan isolasi senyawa pada fraksi aktif ekstrak etil asetat daun jambu mete sehingga senyawa tersebut lebih dimungkinkan untuk dikembangkan sebagai alternatif pengobatan penyakit diabetes melitus tipe 2.

DAFTAR ACUAN

- Ahmad, I., Aqil, F., & Owais, M. (2006). *Modern Phytomedicine: Turning Plants into Drugs*. Aligarh: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Andrade, A. C., Becerra, J. J., & Cardenas, R. V. (2008). α -Glucosidase inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 27 32.
- Badan POM RI. (2004). *Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia
- Basuki, T., Dewiyanti, Indah. D., Artanti, N., & Kardono, L. (2002). Evaluasi Aktivitas Daya Hambat Terhadap Enzim α -Glukosidase Dari Ekstrak Kulit Batang, Daun, Bunga, dan Buah Kemuning. 314-318.
- Champe, P. C., & Harvey, R. A. (2005). *Lippincott's illustrated reviews: Biochemistry, 3rd Edition*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 60-61
- Chisholm-Burns, M. A., Wells, B. G., Schwinghammer, T. L., Malone, P. M., Kolesar, J. M., et al. (2008). *Pharmacotherapy Principles and Practice*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Corwin, E. J. (2001). *Buku Saku Patofisiologi. Ter. Dari Handbook of Pathophysiology oleh Brahm U. Pendit*. Jakarta: EGC. 629, 640.
- de Brito, E. S., de Araujo, M. C., Lin, L.-Z., & Harnly, J. (2007). Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) by LC DAD-ESI/MS. *Food Chemistry* 105. 1112–1118.

- de Melo, E. B., Gomes, A. D., & Carvalho, I. (2006). α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* 62 , 10277-10302.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1985). *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Materia Medika Indonesia jilid III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Materia Medika jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Vademekum Bahan Obat Alam*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia edisi IV*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standard Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. 3-5, 9-12
- Dipiro, J. T., Robert, L., Yees, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., & Posey, L. M. (2005). *Pharmacotherapy A Pathologic Approach*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc. 1205-1226..
- Eisenthal, R., & Danson, M. J. (2002). *Enzyme Assays (2nd ed) A Practical Approach*. . New York: Oxford University.
- Farnsworth, N. R. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Science* 55(3) , 226-276.

- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Grainer bio-one. (2008). *Application Note: UV/VIS Spectroscopy in Microplates UV Star®*, *µClear®*, *MICROLON®* and *CELLSTAR®*. Grainer bio-one.
- Gritter, R., Bobbit, J., & Schwarting, A. (1985). *Pengantar Kromatografi. Terbitan Kedua. Terj. dari Introduction to chromatography oleh Padmawinata K.* Bandung: ITB.
- Harborne, J. B. (1987). *Metode Fitokimia. Ter. Dari Phytochemical Methods oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro.* Bandung: Penerbit ITB.
- Havizah, E. (1996). *Studi pendahuluan tentang efek antimikroba yang terdapat dalam sari daun jambu monyet, daun kembang sepatu, daun kamboja, daun belimbing wuluh dan daun kemangi.* Jakarta: FF UP.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., & Williamson, E. M. (2004). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. London: Churcill Livingstone.
- Kamtchouing, P., Sokeng, S. D., Moundipa, P. F., P., W., Jatsa, H. B., & Lontsi, D. (1998). Protective role of *Anacardium occidentale* extract against streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 62. 95-99.
- Kannan, V. R., Sumathi, C. S., Balasubramanian, V., & Ramesh, N. (2009). Elementary Chemical Profiling and Antifungal Properties of Cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Botany Reasearch International* 2 (4) , 253-257.

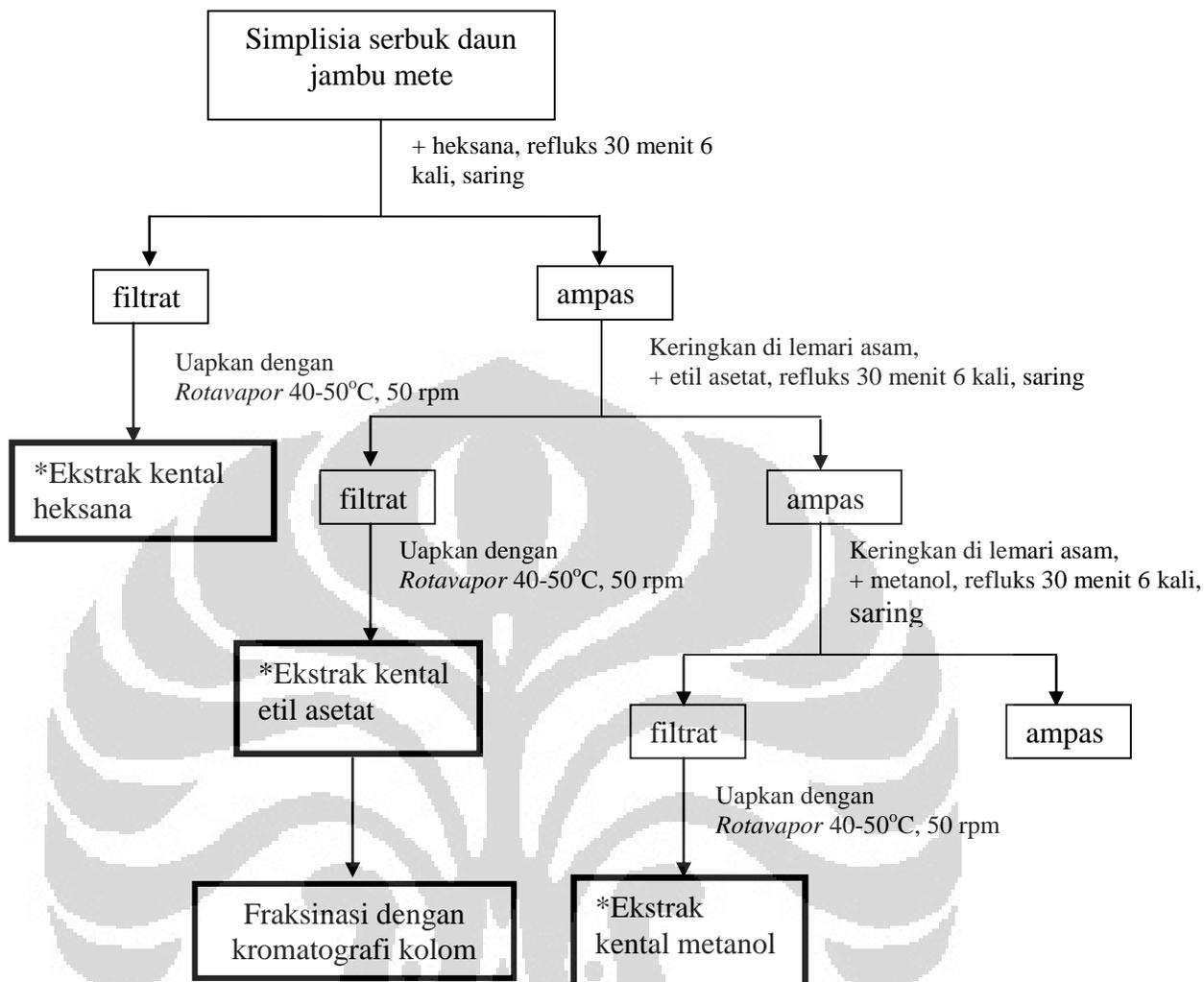
- Kasahara, S., & Hemmi, S. (1986). *Medicinal Herb Index in Indonesia*. P.T. Eisai Indonesia.
- Katzung, B. G., Masters, S. B., & Trevor, A. J. (2009). *Basic & Clinical Pharmacology, Eleventh Edition*. San Fransisco: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Kikkoman. (2001). α -Glucosidase (α GLS-SE) from recombinant Escherichia Coli. 95-98.
- Konan, N. A., & Bacchi, E. M. (2007). Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 112 , 237-242.
- Kim, K. Y., Nam, K. A., Kurihara, H., & Kim, S. M. (2008). Potent α -Glucosidase Inhibitors Purified from the Red Alga (*Grateloupia elliptica*). *Phytochem* 69. 2820-2825.
- Kusmardiyani, S., & Nawawi, A. (1992). *Kimia Bahan Alam*. Bandung: PAU Ilmu Hayati ITB.
- Lee, D.-S. (2000). Dibutyl Phthalate, an α -Glucosidase Inhibitor from *Streptomyces melanosporofaciens*. *Journal of Bioscience And Bioengineering* , 271-273.
- Lee, D.-S., & Lee, S.-H. (2001). Genistein, a soy isoflavone, is a potent α -glucosidase inhibitor. *FEBS Letters* 501 , 84-86.
- Linn, W. D., Wofford, M. R., O'Keefe, M. E., & Pose, L. M. (2009). *Pharmacotherapy in Primary Care*. New York: McGraw-Hill. 279-280, 285-290.

- Masitha, M. (2011). *Skrining Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glukosidase dan Penapisan Fitokimia Dari Beberapa Tanaman Obat Yang Digunakan Sebagai Antidiabetes Di Indonesia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Murray, R. K., Granner, D. K., & Rodwell, V. W. (2009). *Biokimia Harper edisi 27 terjemahan dari Harper's Biochemistry 27th oleh Brahm U.Pendit*. akarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 53, 65, 69-72.
- Nuraini, E. (1992). *Efek analgesik sari alkohol dan sari kloroform daun muda jambu mede pada mencit putih*. JF Farmasi ISTN.
- Pereira, D. F., Cazarolli, L. H., Lavado, C., Mengatto, V., & Maria. (2011). Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition* , 1161 1167.
- Poedjiadi, A. (1994). *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press.
- Rauscher, E., Neumann, U., Schalch, E., Bulow, S. v., & Wahlefeld, A. W. (1985). Optimized condition for determinating activity concentration of α -amilase in serum, with 1,4- α -D-4Nitriphenylmaltoheptaoside as substrate. *Journal of Clinical Chemistry* , 31(1), 14-19.
- Sastrohamidjojo, H. (1985). *Kromatografi*. Yogyakarta: Liberty.
- Septiana, D. (1996). *Pemeriksaan efek analgetik hasil fraksinasi etil asetat daun jambu mete*. Jurusan Farmasi FMIPA UI.
- Shinde, J. e. (2008). α -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) skeels seed kernel in vitro and in goto-kakizaki (GK) rats. *Journal of Carbohydr. Res.*, 343 , 1278–1281.

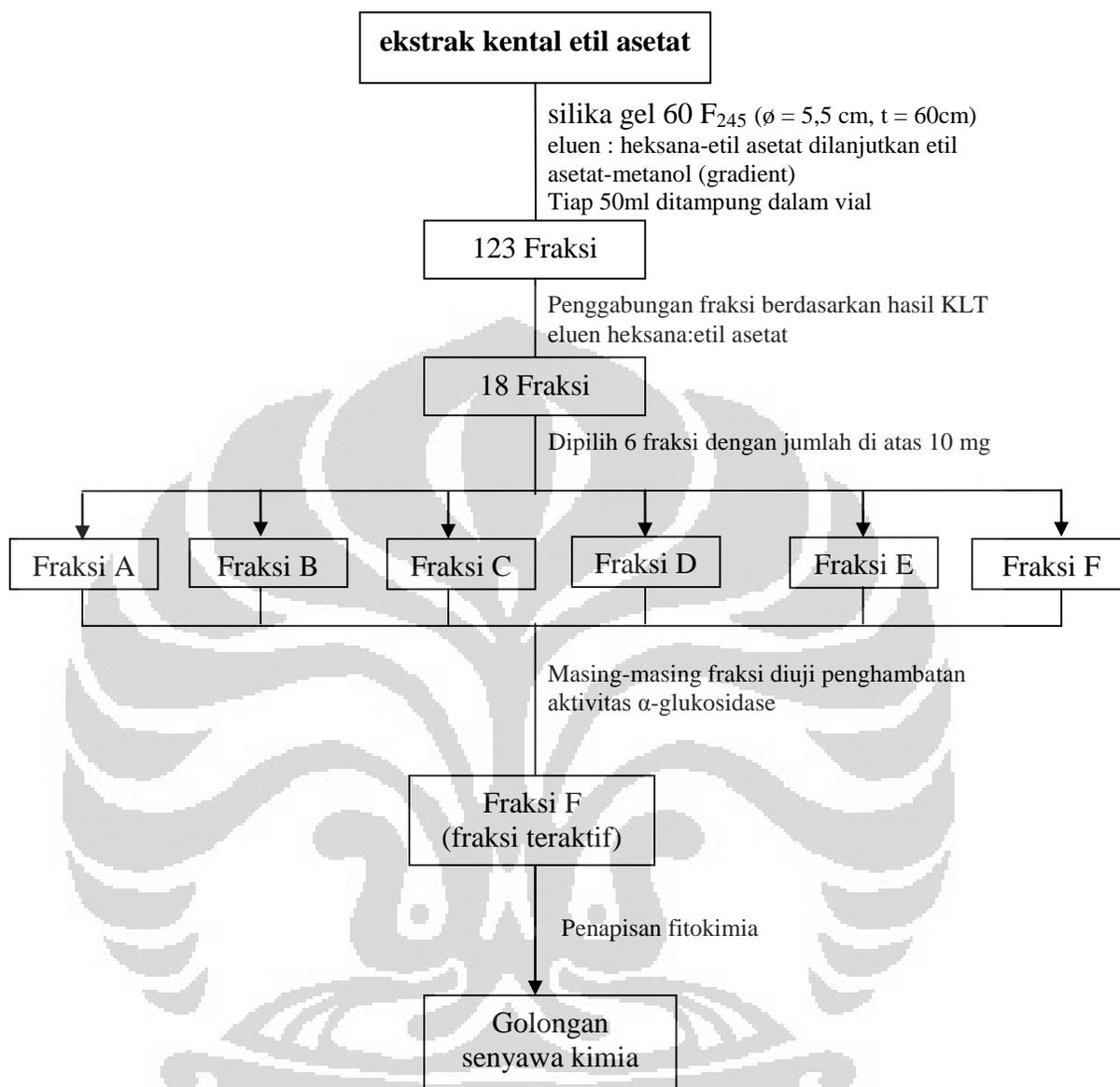
- Sigma Aldrich USA. (1996). Product Information: α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*, recombinant overexpressed in *S. cerevisiae*.
- Sigma-Aldrich. (2012). Certificate of Analysis : α -Glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* - recombinant.
- Sugiwati, S., Setiasih, S., & E., A. (2009). *Antihyperglycemic activity of the mahkota dewa Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.] leaf extracts as an alpha glucosidase inhibitor*. Jakarta: Makara Kesehatan.
- Suhaeti, K. (2009). *Pemeriksaan efek analgesik hasil penyarian ekstrak metanol daun jambu mede (Anacardium occidentale Linn.) pada mencit putih*. Depok: Jurusan Farmasi FMIPA UI.
- Suherman, S. K. (2007). Insulin dan Antidiabetik Oral. dalam S. G. Gunawan, R. Setiabudi, Nafrialdi, & Elysabeth, *Farmakologi dan Terapi* (pp. 481-495). Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapetik FK UI.
- Tjay, T. H., & R., K. (2008). *Obat-obat Penting*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Wagner, H., Zgainski, E. M., & Bladt, S. (1984). *Plant Drug Analysis*. New York: Springer Veriag Berlin Heidelberg.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H. (2004). Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Epidemiology/Health Services/Psychosocial Research* .



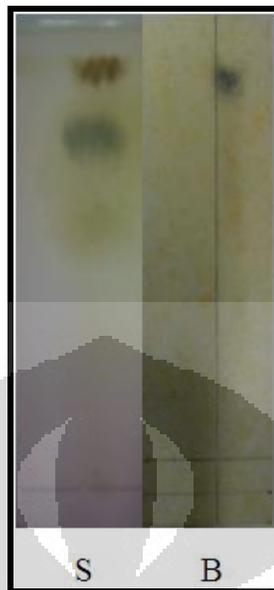
GAMBAR



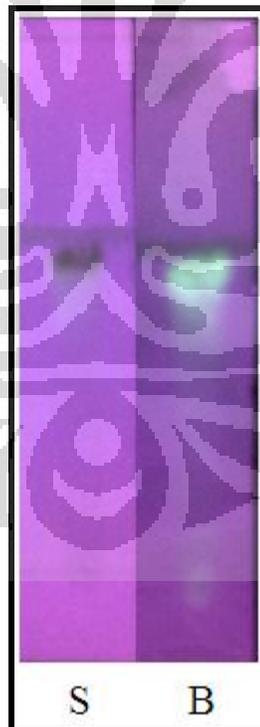
Gambar 3.2 Skema Ekstraksi
*Diuji penghambatan aktivitas α -glukosidase.



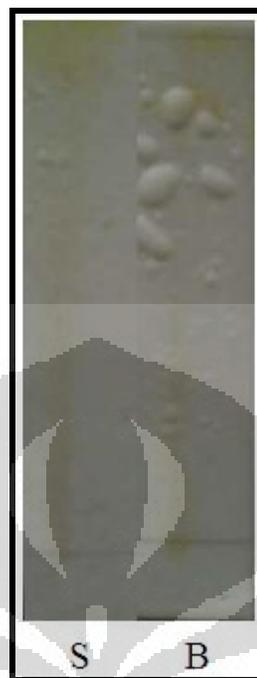
Gambar 3.3 Skema Fraksinasi



Gambar 4.4 Identifikasi senyawa golongan tanin.
S adalah sampel Fraksi F dan B adalah standard ekstrak air Daun Teh



Gambar 4.5 Identifikasi senyawa golongan flavonoid.
S adalah sampel Fraksi F dan B adalah standard Kuersetin



Gambar 4.6 Identifikasi senyawa golongan antrakuinon.
S adalah sampel Fraksi F dan B adalah standard ekstrak etanol Akar Klembak



Gambar 4.7 Identifikasi senyawa golongan saponin.
S adalah sampel Fraksi F dan B adalah standard ekstrak etanol Daun Kumiskucing



Gambar 4.8 Identifikasi senyawa golongan glikosida.
S adalah sampel Fraksi F dan B adalah standard ekstrak etanol Daun Oleander



Gambar 4.9 Microplate Reader Biotek ELX 808



Tabel 4.1 Rendemen ekstrak

Pelarut	Bobot simplisia (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
Heksana	2000	28.6	1,43
Etil asetat	2000	61.5	3,07
Metanol	2000	183.2	9,16

Tabel 4.2 Bobot fraksi hasil kromatografi kolom

Fraksi	Bobot fraksi (mg)
A	200
B	600
C	800
D	400
E	500
F	500

Tabel 4.3. Uji pendahuluan aktivitas variasi waktu inkubasi

Waktu Inkubasi		Serapan (A)		Serapan rata-rata	RSD (%)	U-K	Aktivitas Enzim U/mL
		A ₁	A ₂				
15 menit	Uji (U)	0,110	0,113	0,111	1,892	0,110	0,081
	Kontrol (K)	0,002	0,001	0,0015	46,666		
20 menit	Uji (U)	0,168	0,163	0,165	2,136	0,134	0,0987
	Kontrol (K)	0,036	0,027	0,031	22,903		
30 menit	Uji (U)	0,342	0,348	0,345	1,217	0,333	0,2457
	Kontrol (K)	0,010	0,014	0,012	18,633		
40 menit	Uji (U)	0,140	0,156	0,148	7,432	0,118	0,0869
	Kontrol (K)	0,029	0,032	0,030	7,000		

Keterangan: A₁= Serapan pertama; A₂= Serapan kedua (duplo);

Tabel 4.4. Uji pendahuluan enzim dengan variasi konsentrasi substrat

Konsentrasi Substrat		Serapan (A)		Serapan rata-rata	RSD (%)	U-K	Aktivitas Enzim (U/mL)
		A ₁	A ₂				
0,625 mM	Uji (U)	0,053	0,038	0,045	23,622	0,0425	0,0313
	Kontrol (K)	0,002	0,004	0,003	33,333		
1,25 mM	Uji (U)	0,049	0,071	0,060	25,927	0,052	0,0383
	Kontrol (K)	0,009	0,007	0,008	12,500		
2,5 mM	Uji (U)	0,108	0,116	0,112	5,357	0,107	0,0788
	Kontrol (K)	0,004	0,006	0,005	20,000		
5 mM	Uji (U)	0,162	0,182	0,172	8,139	0,166	0,1222
	Kontrol (K)	0,007	0,005	0,006	16,666		
10 mM	Uji (U)	0,22	0,206	0,213	4,695	0,515	0,1554
	Kontrol (K)	0,003	0,002	0,002	50,000		
20 mM	Uji (U)	0,259	0,239	0,249	5,622	0,233	0,1716
	Kontrol (K)	0,016	0,016	0,016	0		

Keterangan: A₁= Serapan pertama; A₂= Serapan kedua (duplo);

Tabel 4.6. Penghambatan aktivitas α -Glukosidase pada akarbose

Konsentrasi (ppm)		Serapan (A)		Serapan	RSD (%)	S_1-S_0	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
		A ₁	A ₂	rata-rata				
25	S ₁	0,467	0,444	0,455	3,582	0,442	75,313	238,760
	S ₀	0,013	0,014	0,013	5,385			
50	S ₁	0,453	0,448	0,450	0,778	0,434	153,766	
	S ₀	0,015	0,017	0,016	8,838			
75	S ₁	0,41	0,384	0,397	4,635	0,390	183,054	
	S ₀	0,007	0,005	0,006	23,570			
100	S ₁	0,376	0,369	0,372	1,317	0,362	242,677	
	S ₀	0,011	0,009	0,010	14,142			
150	S ₁	0,313	0,323	0,318	2,233	0,315	32,222	
	S ₀	0,002	0,003	0,002	55,902			
B (Blanko)					0,478			
Persamaan regresi					$y = 0.192x + 4.158$			

Keterangan: A₁= Serapan pertama; A₂= Serapan kedua (duplo); S₁= Sampel; S₀= Kontrol Sampel;
 IC₅₀ = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.7. Penghambatan aktivitas α -Glukosidase pada ekstrak heksana

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan	RSD (%)	S_1-S_0	%	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
		A ₁	A ₂	rata-rata			Inhibisi	
50	S ₁	0,436	0,457	0,446	3,318	0,327	401,099	56.169
	S ₀	0,124	0,115	0,119	5,378			
75	S ₁	0,335	0,384	0,359	9,638	0,189	65,293	
	S ₀	0,179	0,161	0,170	7,470			
100	S ₁	0,331	0,329	0,330	0,424	0,082	849,817	
	S ₀	0,257	0,239	0,248	5,121			
125	S ₁	0,339	0,335	0,337	0,682	0,020	962,454	
	S ₀	0,33	0,303	0,316	6,044			
150	S ₁	0,401	0,356	0,378	8,413	-0,032	105,950	
	S ₀	0,408	0,414	0,411	1,022			
B (Blanko)					0,546			
Persamaan regresi					$y = 0,6505x + 13,462$			

Keterangan: A₁= Serapan pertama; A₂= Serapan kedua (duplo); S₁= Sampel; S₀= Kontrol Sampel;
 IC₅₀ = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.8. Penghambatan aktivitas α -Glukosidase pada ekstrak etil asetat

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan	RSD (%)	S_1-S_0	% Inhibisi	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
		A ₁	A ₂	rata-rata				
10	S ₁	0,987	0,976	0,981	0,785	0,228	5,578	43,667
	S ₀	0,782	0,724	0,753	5,445			
20	S ₁	0,948	0,953	0,950	0,368	0,173	28,306	
	S ₀	0,742	0,812	0,777	6,371			
25	S ₁	0,901	0,873	0,887	22,322	0,143	40,207	
	S ₀	0,724	0,763	0,743	3,903			
50	S ₁	0,859	0,914	0,886	4,390	0,091	62,190	
	S ₀	0,841	0,749	0,795	8,189			
75	S ₁	0,711	0,659	0,685	5,372	0,6	75,206	
	S ₀	0,628	0,622	0,625	0,672			
B (Blanko)					0,242			
Persamaan regresi					$y = 0,995x + 6,551$			

Keterangan: A₁= Serapan pertama; A₂= Serapan kedua (duplo); S₁= Sampel; S₀= Kontrol Sampel;
 IC₅₀ = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.9 Penghambatan aktivitas α -Glukosidase pada ekstrak metanol

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	RSD (%)	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
5	S_1	0,608	0,657	0,632	5,475	0.615	-9.617	54.692
	S_0	0,014	0,020	0,017	24,956			
10	S_1	0,516	0,617	0,566	12,615	0.533	5.075	
	S_0	0,027	0,040	0,033	27,878			
25	S_1	0,479	0,486	0,482	1,016	0.413	26.447	
	S_0	0,076	0,063	0,069	13,333			
50	S_1	0,317	0,341	0,329	5,137	0.220	60.730	
	S_0	0,089	0,128	0,108	25,463			
75	S_1	0,305	0,302	0,303	0,693	0.148	73.553	
	S_0	0,158	0,152	0,155	2,709			
100	S_1	0,331	0,264	0,297	15,959	0.097	82.724	
	S_0	0,180	0,221	0,200	14,450			
B (Blanko)					0.5615			
Persamaan regresi					$y = 0,9674x - 2,9093$			

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol Sampel;
 IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.11. Uji penghambatan aktivitas α -Glukosidase pada ekstrak etil asetat Fraksi

F

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan	RSD (%)	S_1-S_0	% Inhibisi	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
		A ₁	A ₂	rata-rata				
5	S ₁	1,320	1,339	1,329	1,008	0,889	27.665	28.760
	S ₀	0,434	0,447	0,440	2,091			
20	S ₁	1,283	1,349	1,316	3,541	0,815	33.686	
	S ₀	0,458	0,544	0,501	12,136			
25	S ₁	1,327	1,358	1,342	1,632	0,697	43.287	
	S ₀	0,616	0,675	0,645	6,465			
50	S ₁	1,851	1,872	1,861	0,795	0,223	81.814	
	S ₀	1,613	1,663	1,638	2,155			
75	S ₁	1,625	1,658	1,641	1,419	0,019	98.454	
	S ₀	1,612	1,633	1,622	0,912			
B (Blanko)					1.229			
Persamaan regresi					$y = 1.113x + 17.99$			

Keterangan: A₁= Serapan pertama; A₂= Serapan kedua (duplo); S₁= Sampel; S₀= Kontrol Sampel;
 IC₅₀ = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.12. Hasil uji kinetika penghambatan aktivitas enzim ekstrak etil asetat Fraksi F 20 $\mu\text{g/mL}$

Konsentrasi Substrat	Serapan (V)		1/[Substrat]	1/V ₀	1/V ₁
	V ₀	V ₁			
20 mM	1.24	0.845	0.05	0.8064516	1.183432
10 mM	1.291	0.841	0.1	0.7745933	1.1890606
5 mM	1.094	0.657	0.2	0.9140768	1.52207
2,5 mM	0.603	0.399	20	1.24	0.845

Keterangan : V₀ = Tanpa inhibitor; V₁ = inhibitor 20 ppm

Tabel 4.13. Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten ekstrak etil asetat Fraksi F 20 $\mu\text{g/mL}$

	a	b	V _{max}	K _m
Tanpa inhibitor	0,555	2,576	18,018	46,414
Inhibitor 20 $\mu\text{g/mL}$	0,857	3,963	11,668	46,242



LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Identifikasi Tanaman



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

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

Cibinong, 6 Maret 2012

Nomor : 314/IPH.1.02/lf.8/III/2012
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). Indah Nur F.
Mhs. Univ. Indonesia
Jakarta

Dengan hormat,

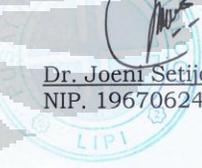
Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Daun Jambu Mente	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Anacardiaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,


Dr. Joeni Setijoe Rahajoe
NIP. 196706241993032004



D:\Ident 2012\Indah Nur F..doc\IS-DG

Page 1 of 1

Lampiran 2. Sertifikat Analisis Enzim α -Glukosidase

SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

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

Certificate of Analysis

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

Product Number: **G0660**
 Lot Number: **SLBB4081V**
 Brand: **SIGMA**
 CAS Number: 9001-42-7
 MDL Number: MFCD00081321
 Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
 Quality Release Date: 04 JAN 2012
 Recommended Retest Date: JAN 2016

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

Rodney Burbach

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

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

Version Number: 1 Page 1 of 1

Lampiran 3. Sertifikat Analisis Enzim Sustrat 4-Nitrofenil- α -D-Glukopiranosida (PNPG)

SIGMA-ALDRICH		SIGMA
		Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland Tel: +41 81 755 2511 Fax: +41 81 756 5449
Certificate of Analysis		
Product Name:	4-NITROPHENYL α -D-GLUCOPYRANOSIDE	
Product Number:	N1377	
Product Brand:	Sigma	
Molecular Formula:	C ₁₂ H ₁₂ NO ₆	
Molecular Mass:	301.25	
CAS Number:	3767-28-0	
TEST	SPECIFICATION	LOT BCBG2931V RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF-WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (TLC AREA %)	≥99 %	99.0 %
SPECIFIC ROTATION (20/D)	210 - 220 DEGREES	210.1 DEGREES
CONCENTRATION	C=1 IN WATER	C=1 IN WATER
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS TO YELLOW-GREEN	VERY FAINT YELLOW-GREEN
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR TO VERY SLIGHTLY HAZY	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	20 MG/ML IN METHANOL	20 MG/ML IN METHANOL
QC RELEASE DATE	09/AUG/11	
RECOMMENDED RETEST DATE	JUL/16	
 Dr. Claudia Geitner Manager Quality Control Buchs, Switzerland		
<p><small>Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the "Certificate of Analysis" are the results determined at the time of analysis.</small></p>		
Sigma-Aldrich	Certificate of Analysis - Product N1377 Lot BCBG2931V	Page 1 of 1