



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIDIABETES DENGAN  
PENGHAMBATAN AKTIVITAS ALFA-GLUKOSIDASE DARI  
KULIT BATANG KAYU TUAH (*Antidesma celebicum* Miq.)  
DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI  
FRAKSI TERAKTIF**

**SKRIPSI**

**FEBRIYANTI  
0806398190**

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



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIDIABETES DENGAN METODE  
PENGHAMBATAN AKTIVITAS ALFA-GLUKOSIDASE DARI  
KULIT BATANG KAYU TUAH (*Antidesma celebicum* Miq.)  
DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI  
FRAKSI TERAKTIF**

**SKRIPSI**

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

**FEBRIYANTI  
0806398190**

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

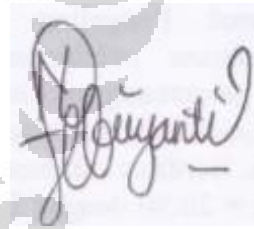
ii

## **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 plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 30 Juni 2012



Febriyanti

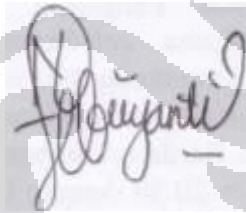
## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Febriyanti

NPM : 0806398190

Tanda Tangan :



Tanggal : Juli 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama :Febriyanti  
NPM :0806398190  
Program Studi :Sarjana Farmasi  
Judul Skripsi :Uji Aktivitas Antidiabetes dengan Penghambatan Aktivitas Alfa-glukosidase dari Kulit Batang Kayu Tuah (*Antidesma celebicum* Miq.) dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif

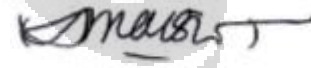
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Berna Elya., Apt, M.Si

(  )

Pembimbing II : Dr. Amarila Malik., Apt, M.Si

(  )

Penguji 1 : Dr. Katrin, M.S.

(  )

Penguji II : Dra. Maryati Kurniadi., Apt, M.Si

(  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 9 Juli 2012

## KATA PENGANTAR

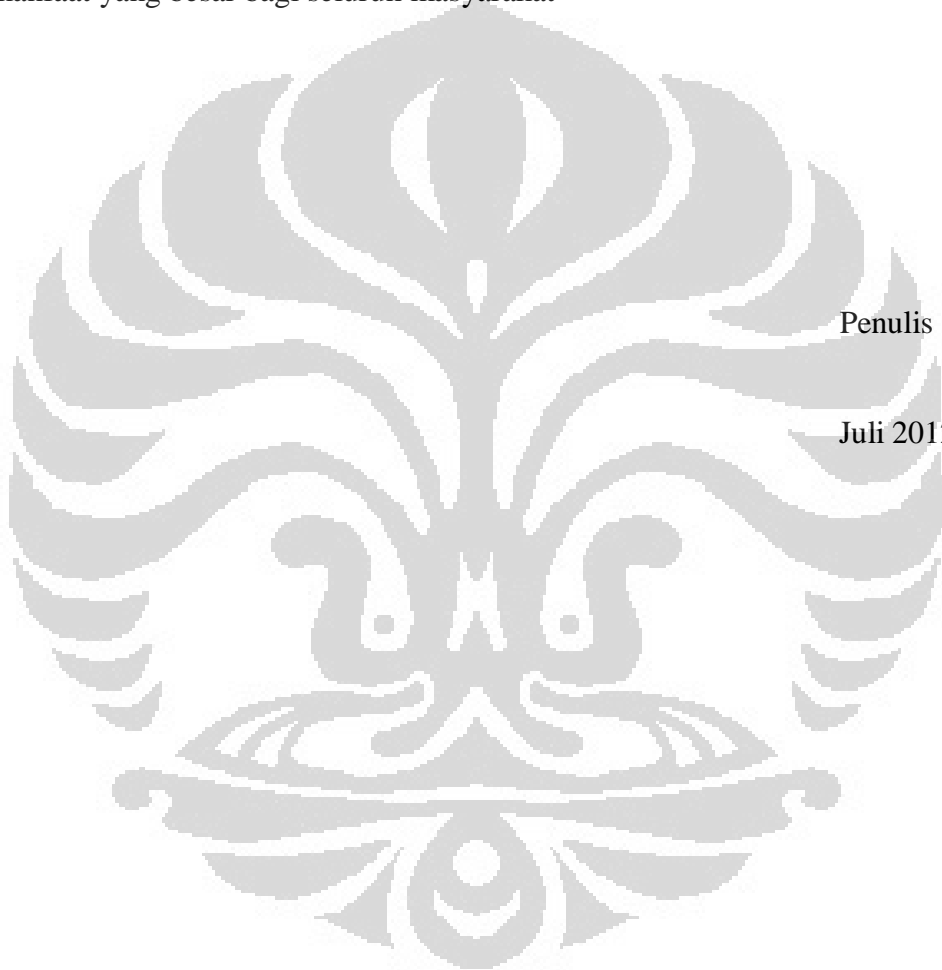
Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas rahmat dan anugerah-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Dalam kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- 1) Ibu Dr. Berna Elya, M.Si selaku dosen pembimbing akademik dan dosen pembimbing skripsi yang dengan sabar membimbing dan memberikan saran, serta menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran dalam penelitian dan penyusunan skripsi;
- 2) Ibu Dra.Amarila Malik Apt.,M.Si selaku dosen pembimbing skripsi yang telah membantu saya dalam menyelesaikan menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini;
- 3) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
- 4) Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Departemen;
- 5) PT. Dexe Medica yang telah memberikan standar akarbose untuk membantu dalam memperoleh data yang diperlukan agar skripsi saya dapat berjalan dengan lancar;
- 6) Pihak Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Kebun Raya Bogor yang telah banyak membantu dalam usaha memperoleh data yang saya perlukan;
- 7) Keluarga terutama kedua orang tua, Ridwan Nurcahya dan Lenie Efendi yang selalu memberikan dorongan, semangat dan doa demi kelancaran dan kesuksesan skripsi yang telah dijalani;
- 8) Sahabat EGC, Cyntiani, Ester, Evelina, Gladys, Natalia, Vanie, dan Jurik . sahabat kepo, teman-teman paralel 2008, keluarga farmasi, dan teman-

teman KBI fitokimia yang telah memberikan banyak masukan dan semangat dalam menyelesaikan penelitian ini;

- 9) Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu selama penelitian dan dalam proses penyusunan skripsi.

Penulis tak dapat memberikan sesuatu yang berharga selain ucapan terima kasih dan berdoa semoga Bapa di Surga membalas segala kebaikan mereka. Semoga skripsi ini dapat berguna bagi ilmu pengetahuan dan memberikan manfaat yang besar bagi seluruh masyarakat



Penulis

Juli 2012

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

---

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

Nama : Febriyanti  
NPM : 0806398190  
Program Studi : Sarjana  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

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

Uji Aktivitas Antidiabetes dengan Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase dari Kulit Batang Kayu Tuah (*Antidesma celebicum* Miq.) dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif

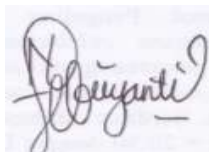
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : Juli 2012

Yang menyatakan



( Febriyanti)

viii



## ABSTRAK

Nama : Febriyanti  
Program Studi : S1 Farmasi  
Judul : Uji Aktivitas Antidiabetes dengan Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase dari Kulit Batang Kayu Buah (*Antidesma celebicum* Miq.) dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif

Diabetes melitus adalah gangguan metabolisme lemak, karbohidrat, dan protein dikarenakan kecacatan dalam sekresi insulin, sensitivitas insulin atau keduanya. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh fraksi teraktif dari ekstrak kulit batang kayu buah (*Antidesma celebicum* Miq.) terhadap penghambatan enzim alfa-glukosidase dan mengetahui senyawa yang terkandung dalam fraksi aktif tersebut. Salah satu mekanisme pengobatan diabetes adalah dengan menghambat enzim alfa-glukosidase. Serbuk dari kulit batang kayu buah (*Antidesma celebicum* Miq.) di refluks dengan etanol 80%, kemudian dilakukan fraksinasi cair-cair dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol. Pengujian aktivitas antidiabetes dari kulit batang kayu buah (*Antidesma celebicum* Miq.) menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm. Hasil uji menunjukkan bahwa fraksi etil asetat kulit batang kayu buah (*Antidesma celebicum* Miq.) memiliki penghambatan terbesar dengan  $IC_{50}$  8,06 ppm. Berdasarkan hasil kolom fraksi yang aktif terdapat pada fraksi heksan:etil asetat = 20:80 dengan  $IC_{50}$  5,60 ppm. Uji kinetika menunjukkan bahwa ekstrak kulit batang kayu buah (*Antidesma celebicum* Miq.) mempunyai mekanisme penghambatan kompetitif. Golongan senyawa kimia yang terdapat dalam fraksi etil asetat dan fraksi teraktif hasil kolom kulit batang kayu buah (*Antidesma celebicum* Miq.) adalah senyawa terpen, saponin, fenol, dan gula.

Kata Kunci : kulit batang kayu buah (*Antidesma celebicum* Miq.), diabetes melitus, penghambat alfa glukosidase.

xvi + 101 halaman : 10 gambar; 34 tabel; 11 lampiran

Daftar Pustaka : 45 (1966-2012)

## ABSTRACT

Name : Febriyanti  
Program study : S1 Pharmacy  
Title : Antidiabetic Activity Test with Alpha-glucosidase Inhibition Activity from Kayu Tuah (*Antidesma celebicum* Miq.) stem bark and Identification Phytochemical Constituent from The Most Active Fraction

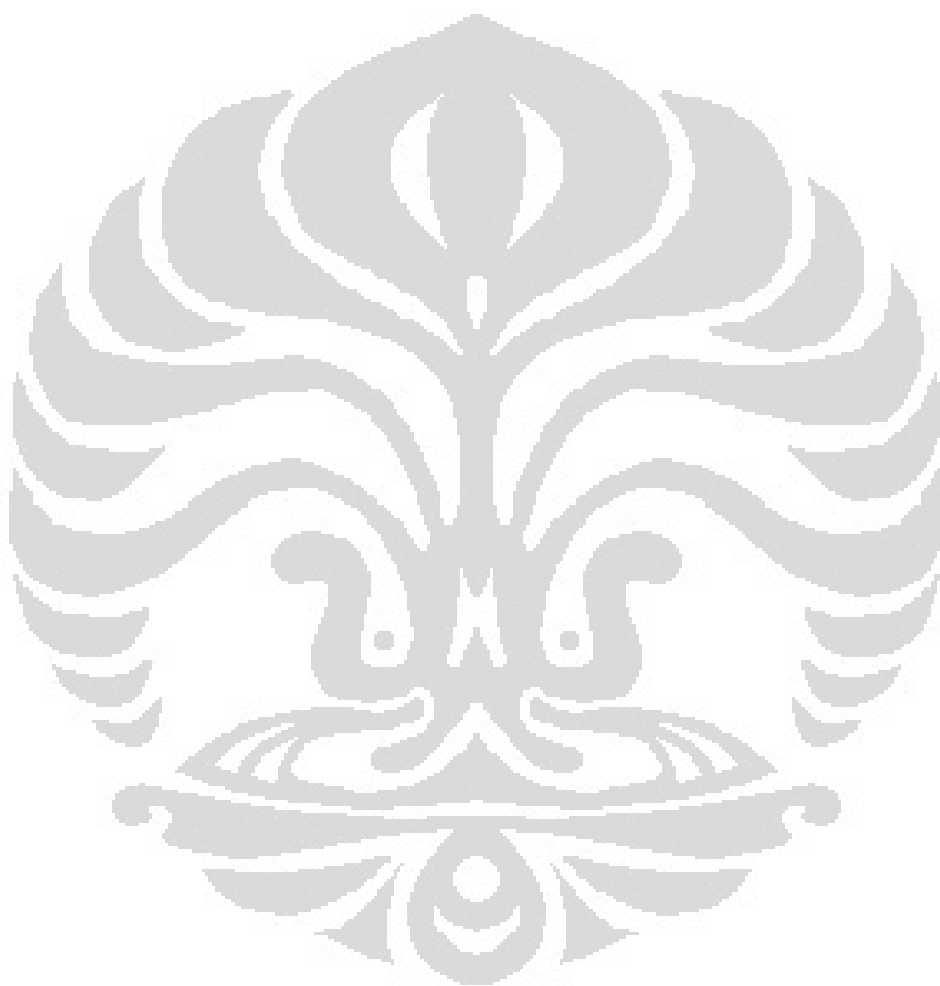
Diabetes mellitus is a disorder of the metabolism of fat, carbohydrate, and protein due to defects in insulin secretion, insulin sensitivity or both. This research aims to obtain an active fraction from kayu tuah (*Antidesma celebicum* Miq.) stem bark extract on the inhibition of the enzyme alpha-glucosidase and identify compounds that contained in the most active fraction. One of the mechanisms for diabetes treatment is inhibited the enzyme alpha-glucosidase. The simplisia powder was extracted using ethanol 80% by reflux, then extraction is fractioned by liquid-liquid using n-hexane, ethyl acetate, and methanol solvent. The test of antidiabetic activity of kayu tuah (*Antidesma celebicum* Miq.) stem bark is characterized with UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 400 nm. The test results has shown the fraction of ethyl acetate have a stronger inhibition with IC<sub>50</sub> value 8.06 ppm. Based on the results from the most active column fractions contained in the fraction of n-hexane: ethyl acetate = 20:80 with IC<sub>50</sub> value 5.60 ppm. Test showed that the kinetics of the extract kayu tuah (*Antidesma celebicum* Miq.) stem bark have competitive inhibition mechanism. Phytochemical constituent in the ethyl acetate fraction and the most active column fraction kayu tuah (*Antidesma celebicum* Miq.) stem bark are terpenes, saponins, phenols, and sugars.

Key Words : kayu tuah (*Antidesma celebicum* Miq.) stem bark, diabetes mellitus, alpha-glucosidase inhibitor.  
xvi + 101 pages : 10 pictures; 34 tables; 11 appendices  
Bibliography : 45 (1966-2012)

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xvi</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	3
1.3 Manfaat .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Kayu Tuah ( <i>Antidesma celebicum</i> . Miq).....	4
2.2 Simplisia .....	5
2.3 Ekstraksi dan Metode Ekstrak .....	5
2.4 Diabetes Melitus .....	7
2.5 Pola Kromatogram .....	13
2.6 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia.....	16
2.7 Enzim.....	19
2.8 Spektrofotometri UV-Vis .....	24
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>26</b>
3.1 Lokasi dan Waktu.....	26
3.2 Alat.....	26
3.3 Bahan .....	26
3.4 Prosedur Pelaksanaan.....	27
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>46</b>
4.1 Persiapan Bahan Uji .....	46
4.2 Uji Pendahuluan.....	48
4.3 Uji Aktivitas Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase .....	50
4.4 Kromatografi Kolom .....	52
4.5 Kromatografi Lapis Tipis .....	53
4.6 Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase dari Fraksi Teraktif.....	54

4.7	Identifikasi Golongan Senyawa Kimia .....	56
<b>BAB 5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>61</b>
5.1	Kesimpulan .....	61
5.2	Saran .....	61
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>		<b>62</b>



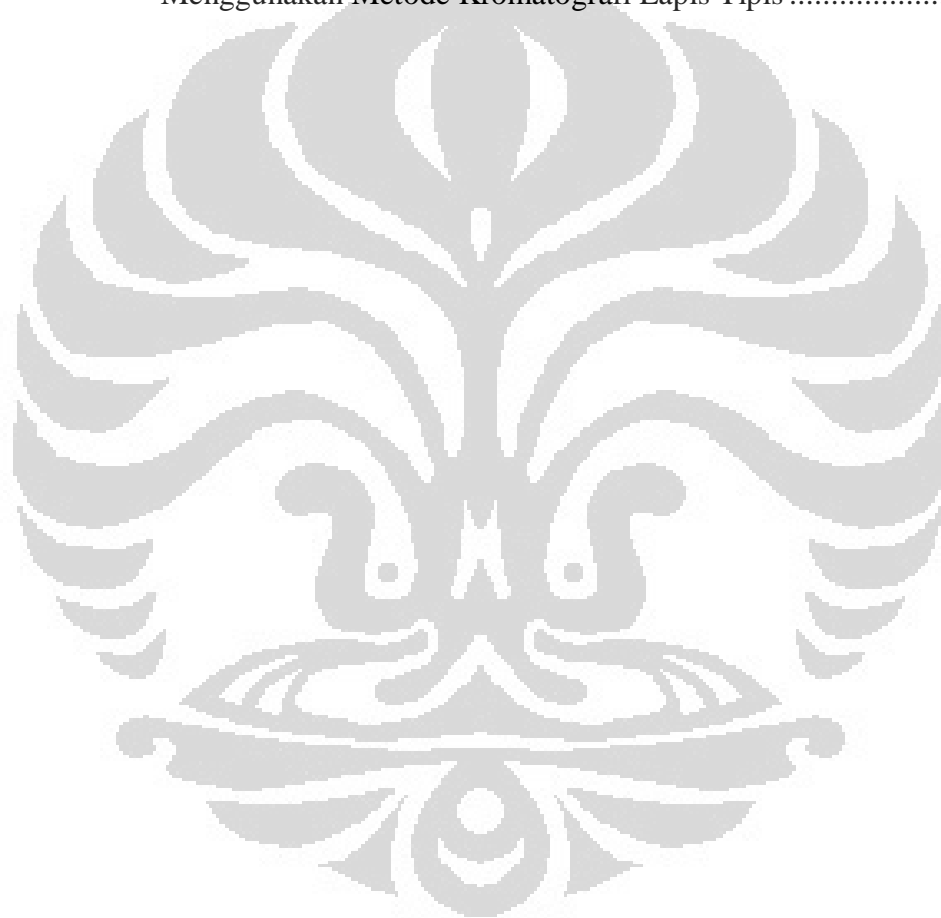
## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur Kimia Akarbose .....	13
Gambar 2.2	Persamaan Reaksi Enzimatik Alfa-Glukosidase dan <i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D -glukopiranosida.....	21
Gambar 2.3	Plot Resiprokal-Ganda atau Lineweaver-Burk Digunakan untuk Mengevaluasi Nilai $K_m$ dan $V_{max}$ .....	22
Gambar 2.4	Plot Lineweaver-Burk dari Inhibisi Kompetitif.....	23
Gambar 2.5	Plot Lineweaver-Burk untuk Inhibisi Non Kompetitif .....	24
Gambar 4.1	Kurva Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Konsentrasi Substrat <i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) 1; 2; 2,5; 5; 10; 15; 20; dan 30 mM.....	49
Gambar 4.2	Plot Lineweaver-Burk Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Kayu Tuah 0,25% (10,07 ppm) dengan Konsentrasi <i>p</i> -nitrofenil $\alpha$ -D-glukopiranosida 10; 5; 2,5; dan 1,25 mM.....	56
Gambar 4.3	Pohon Kayu Tuah (a) dan (b) .....	66
Gambar 4.4	Batang Kayu Tuah ( <i>Antidesma celebicum</i> Miq.).....	66
Gambar 4.5	Identifikasi Terpen Ekstrak Etanol 80%, Hasil Partisi Etil Asetat, dan Fraksi Hasil Kolom yang Paling Aktif (Fraksi E).....	67

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Jenis Sediaan Insulin.....	11
Tabel 3.1	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum .....	33
Tabel 3.2	Prosedur Optimasi Konsentrasi Substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG).....	34
Tabel 3.3	Prosedur Optimasi pH Dapar Fosfat .....	35
Tabel 3.4	Prosedur Optimasi Suhu Inkubasi .....	36
Tabel 3.5	Prosedur Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim.....	40
Tabel 4.1	Hasil Pengujian Penghambatan Enzim Alfa-Glukosidase dari Hasil Partisi Cair-Cair .....	52
Tabel 4.2	Data Kinetika <i>Lineweaver-Burk Plot</i> .....	55
Tabel 4.3	Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten.....	55
Tabel 4.4	Persentase Penyusutan Bobot Simplisia Kulit Batang Kayu Tuah Setelah Dikeringkan .....	68
Tabel 4.5	Rendemen Ekstrak Etanol 80% Ranting Kayu Tuah.....	68
Tabel 4.6	Jumlah Berat Hasil Partisi Cair-Cair .....	68
Tabel 4.7	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Konsentrasi Substrat....	69
Tabel 4.8	Data Aktivitas Enzim.....	70
Tabel 4.9	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi pH .....	71
Tabel 4.10	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Suhu Inkubasi.....	71
Tabel 4.11	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Akarbose sebagai Pembanding.....	72
Tabel 4.12	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Kuersetin sebagai Pembanding .....	73
Tabel 4.13	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase Partisi n-Heksana.....	74
Tabel 4.14	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase Partisi Etil Asetat.....	75
Tabel 4.15	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase Partisi Metanol .....	76
Tabel 4.16	Perbandingan Eluen Hasil Kromatografi Kolom dan Hasil Gabungan Fraksi.....	77
Tabel 4.17	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi A.....	78
Tabel 4.19	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi B .....	79
Tabel 4.19	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi C.....	80
Tabel 4.20	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi D.....	81
Tabel 4.21	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi E .....	82
Tabel 4.22	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi F .....	83

Tabel 4.23	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi G.....	84
Tabel 4.24	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi H.....	85
Tabel 4.25	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi I.....	86
Tabel 4.26	Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi J.....	87
Tabel 4.27	Hasil Identifikasi Golongan Senyawa Pada Ekstrak Etanol 80%, Fraksi Etil Asetat dan Fraksi Teraktif Hasil Kolom Kayu Buah .....	88
Tabel 4.28	Hasil Identifikasi Golongan Senyawa Pada Ekstrak Etanol 80%, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi Teraktif Hasil Kolom Kayu Buah Menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis .....	89



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Skema Prosedur Pelaksanaan .....	90
Lampiran 2	Skema Persiapan Sampel dan Ekstraksi .....	91
Lampiran 3	Skema Fraksinasi .....	92
Lampiran 4	Skema Kerja Ekstrak Kulit Batang Kayu Buah.....	93
Lampiran 5	Skema Uji Aktivitas Penghambatan Alfa-Glukosidase (Blanko dan Sampel) .....	95
Lampiran 6	Skema Uji Aktivitas Penghambatan Alfa-Glukosidase (Kontrol) .....	96
Lampiran 7	Perhitungan unit enzim alfa glukosidase .....	97
Lampiran 8	Skema Pembuatan Larutan Enzim Alfa-Glukosidase 0,15 U/mL.....	98
Lampiran 9	COA Alfa-Glukosidase .....	99
Lampiran 10	COA Substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) .....	100
Lampiran 11	Hasil Determinasi Kulit Batang Kayu Buah ( <i>Antidesma celebicum</i> Miq.) oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).....	101



# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Diabetes melitus merupakan gangguan metabolisme lemak, karbohidrat, dan protein yang disebabkan oleh kecacatan dalam sekresi insulin, sensitivitas insulin atau keduanya (Dipiro, *et al.*, 2005). Jika insulin tidak tersedia dalam tubuh, maka glukosa akan tertimbun dalam darah dan segera diekskresikan kedalam urin. Penderita diabetes akan merasa haus, berat badan menurun, dan berasa lelah disebabkan karena banyaknya urin yang dikeluarkan. Produksi kemih akan meningkat dan pasien menjadi lebih sering untuk berkemih (Tjay dan Rahardja, 2002).

Diantara penyakit degeneratif, diabetes merupakan salah satu penyakit tidak menular dimana prevalensinya selalu meningkat. Pada penelitian terakhir antara tahun 2001 dan 2005 di daerah Depok didapatkan prevalensi penderita diabetes melitus tipe 2 sebesar 14,7% dan di Makasar sekitar 12,5% (Sudoyo, Setyohadi, Alwi, Simadibrata, & Setiati, 2006). Diperkirakan pada tahun 2025 penyakit ini dapat tumbuh hingga 380 juta orang (Dong, Li, Feng, Liu, & Huang, 2012).

Diabetes melitus terdiri dari tiga tipe, yaitu diabetes tipe 1 (Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (IDDM)), diabetes tipe 2 (Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM)), dan diabetes gestational. Diabetes tipe 1 jarang terjadi dan diperkirakan terdapat sekitar 5-10% dari populasi penderita diabetes. Diabetes tipe 1 disebabkan oleh pulau Langerhans yang rusak karena reaksi autoimun dan virus, seperti Cocksakie, Rubella, CM Virus, Herpes, dan lain sebagainya. Diabetes tipe 2 merupakan tipe yang lebih banyak penderitanya dibandingkan dengan tipe 1. Diabetes melitus tipe 2 disebabkan oleh sensitivitas insulin berkurang, gangguan dalam sekresi insulin, dan produksi glukosa hepatic

yang berlebihan. Faktor genetik, lingkungan, obesitas, diet tinggi lemak dan rendah serat, serta kurang gerak badan merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi resistensi terhadap insulin. Pada penderita diabetes melitus tipe 2 pulau Langerhans tidak mengalami kerusakan sehingga insulin tidak perlu untuk diberikan. (Ditjen, 2005).

Pengobatan diabetes dapat dilakukan dengan injeksi insulin atau dengan menggunakan obat modern seperti antidiabetes oral. Pengobatan dengan menggunakan injeksi insulin biasanya digunakan untuk diabetes tipe 1. Sedangkan, untuk diabetes tipe 2 menggunakan pengobatan dengan antidiabetes oral.

Akarbose merupakan salah satu obat diabetes oral untuk pengobatan diabetes tipe 2. Mekanisme kerja obat ini yaitu menghambat kerja aktivitas alfa-glukosidase yang berperan dalam konversi karbohidrat menjadi glukosa. Sehingga dapat menurunkan HbA1c sekitar 0,5-1% pada pasien dengan diabetes tipe 2 (Hanefeld, 2008).

Penggunaan obat-obat konvensional seperti akarbose dapat mengganggu gastrointestinal sehingga tidak sedikit masyarakat yang beralih dari obat konvensional menuju obat herbal (Hanefeld, 2008). Selain mengurangi efek samping dari obat-obat konvensional, obat dari bahan alam relatif lebih murah. Hal ini dapat membantu pasien diabetes dalam hal biaya karena obat diabetes digunakan dalam jangka waktu yang cukup lama.

Tanaman dari suku Euphorbiaceae mempunyai aktivitas penghambatan alfa-glukosidase, salah satu diantaranya adalah kayu tuah (*Antidesma celebicum* Miq.). Berdasarkan penelitian terdahulu,  $IC_{50}$  ekstrak etanol 80% yang berasal dari kulit batang kayu tuah (*Antidesma celebicum* Miq.) sebesar 3,9265 (Elya, Katrin, Mun'im, Yuliasuti, Bangun, Septiana, 2012).

Pada penelitian ini akan dilakukan pengujian penghambatan aktivitas alfa-glukosidase dari kulit batang kayu tuah dalam menghambat aktivitas alfa-glukosidase menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum 400 nm dan mengidentifikasi senyawa kimia dari fraksi teraktif.

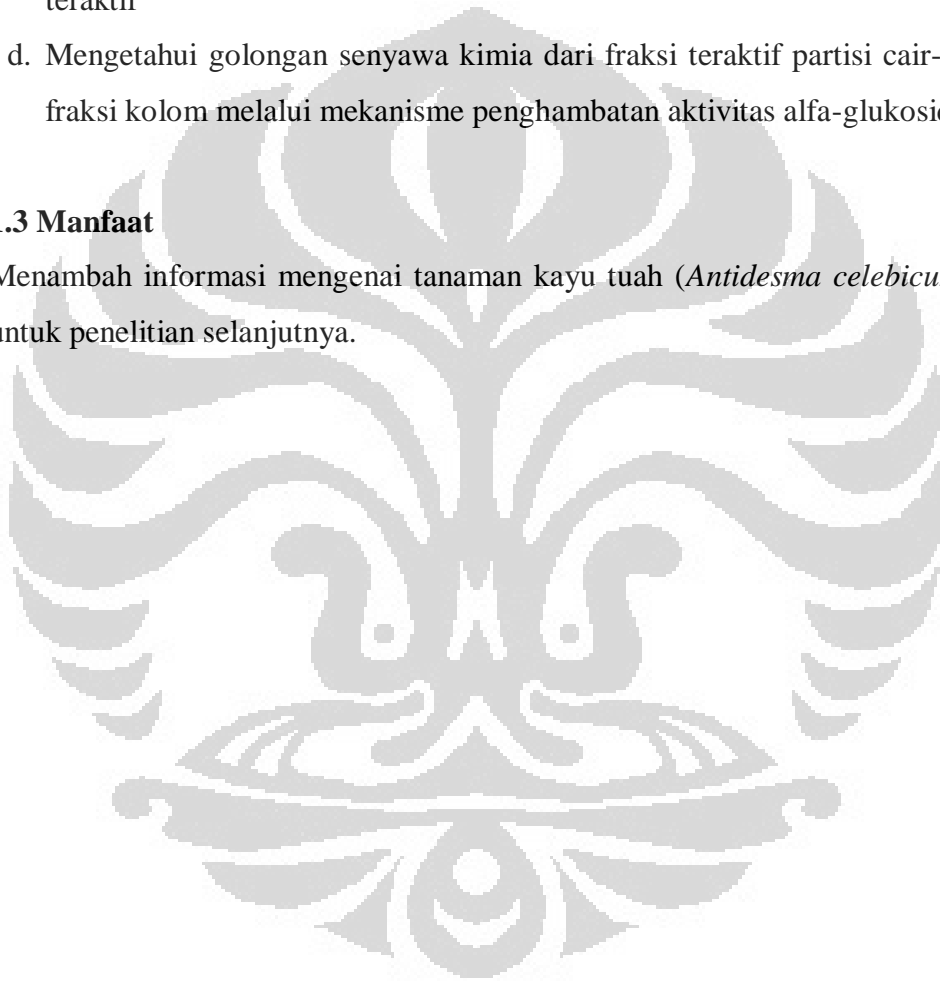
## 1.2 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

- a. Memperoleh fraksi partisi cair-cair yang memiliki aktivitas penghambatan alfa-glukosidase tertinggi dari ekstrak kulit batang kayu tuah.
- b. Memperoleh fraksi kolom yang memiliki aktivitas penghambatan alfa-glukosidase tertinggi
- c. Menentukan mekanisme kinetika penghambatan fraksi partisi cair-cair teraktif
- d. Mengetahui golongan senyawa kimia dari fraksi teraktif partisi cair-cair dan fraksi kolom melalui mekanisme penghambatan aktivitas alfa-glukosidase.

## 1.3 Manfaat

Menambah informasi mengenai tanaman kayu tuah (*Antidesma celebicum* Miq.) untuk penelitian selanjutnya.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kayu Tuah (*Antidesma celebicum* Miq.)

Taksonomi dari tanaman kayu tuah (Jones & Luchsinger, 1987; Indonesian Institute of Science National Biological, 1985) :

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta (Angiospermae)
Kelas	: Magnoliopsida (Dicotyledonae)
Bangsa	: Euphorbiales
Suku	: Euphorbiaceae
Marga	: <i>Antidesma</i>
Jenis	: <i>Antidesma celebicum</i> Miq.
Nama daerah	: Kayu tuah (Sulawesi); Lombopale hutan; Ruomo. (Maluku: Halmahera) O kadateke (Hoffmann, 2006).

Tumbuhan kayu tuah berupa pohon dengan tinggi sampai dengan 25 m, diameter batang hingga 37 cm. Pohon ini mempunyai lebih dari satu batang, ranting muda berbentuk silinder. Kulit pohon berwarna abu-abu atau coklat dengan tebal 1 mm. Kulit kayu bagian dalam berwarna coklat, kuning, merah muda atau coklat kemerahan. Daun memanjang sampai eliptik atau sedikit bulat telur, memiliki panjang 10-15 cm dan lebar 4,5-6,5 cm, hanya berbulu sepanjang tulang daun bagian atas dari permukaan daun dan sepanjang tulang daun bagian bawah permukaan daun, kusam pada kedua permukaan daun, dan berwarna hijau hingga hijau ke abu-abuan pada kedua permukaan daun. Bunga berbentuk mangkuk dan bulat (Hoffmann, 2006).

Distribusi dari tanaman ini yaitu Sulawesi, Sangi, Kepulauan Talud, Kepulauan Sunda Kecil (Timor), dan Maluku (Pulau Bacan dan Halmahera). Ekologinya berada pada ketinggian permukaan laut hingga 1200 m (Hoffmann, 2006). Dalam ekstrak etanol 80%, kulit batang kayu tuah mengandung glikosida, tanin, dan saponin. Berdasarkan penelitian sebelumnya, kulit batang kayu tuah dapat menghambat aktivitas alfa-glukosidase (Elya, *et al.*, 2012).

## 2.2 Simplisia (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000)

Simplisia merupakan bahan yang berasal dari alam yang dapat digunakan sebagai obat dimana bahan alam tersebut belum diolah dan masih berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dapat dibedakan menjadi 3 yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan (mineral). Simplisia nabati merupakan simplisia berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan ataupun eksudat tumbuhan. Eksudat adalah isi sel dari tumbuhan yang secara spontan keluar dari tumbuhan atau isi sel yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya dan belum berupa senyawa kimia murni.

Simplisia merupakan suatu produk asli dari pertanian. Oleh karena itu, kandungan kimia belum dapat diketahui secara pasti dan jumlah dari metabolit sekunder tidak konstan karena adanya beberapa variabel yang mempengaruhi pertumbuhan dari tanaman seperti bibit, tempat tumbuh, iklim, dan kondisi (umur dan cara) panen, serta proses pasca panen dan preparasi akhir. Ada yang menyebutkan bahwa variabel-variabel tersebut tidak terlalu banyak dalam hal mempengaruhi mutu ekstrak dan dapat dikompensasi dengan penambahan atau pengurangan bahan setelah melewati prosedur analisis kimia dan menggunakan teknologi farmasi lanjutan sehingga tidak berdampak banyak pada khasiat produknya.

## 2.3 Ekstrak dan Metode Ekstrak (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000)

Menurut Farmakope Indonesia Edisi 4, ekstrak merupakan sediaan pekat yang dapat diperoleh dengan cara mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan.

Ekstrak cair adalah sediaan cair simplisia nabati, yang mengandung etanol sebagai pelarut atau sebagai pengawet atau sebagai pelarut dan pengawet. Jika tidak dinyatakan lain, pada masing-masing monografi, tiap ml ekstrak mengandung bahan aktif dari 1 g simplisia yang memenuhi syarat ekstrak cair

yang cenderung membentuk endapan dapat didiamkan dan disaring atau bagian yang bening dienaptuangkan. Beningan yang diperoleh memenuhi persyaratan farmakope. Ekstrak cair dapat dibuat dari ekstrak yang sesuai.

Ekstraksi adalah suatu metode operasi yang digunakan dalam proses pemisahan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan sejumlah massa bahan (*solven*) sebagai tenaga pemisah. Metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut terbagi menjadi 2 bagian yaitu cara dingin dan cara panas (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000).

### 2.3.1 Cara dingin

#### 2.3.1.1 Maserasi

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

#### 2.3.1.2 Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Prosesnya terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan dan penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

### 2.3.2 Cara panas

#### 2.3.2.1 Refluks

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

### 2.3.2.2 Soxhlet

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

### 2.3.2.3 Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50<sup>0</sup>C.

### 2.3.2.4 Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98<sup>0</sup>C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

### 2.3.2.5 Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama ( $\geq 30^0\text{C}$ ) dan temperatur sampai titik didih air.

## 2.4 Diabetes Melitus (Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2005)

### 2.4.1 Pengertian Diabetes

Diabetes melitus merupakan penyakit gangguan metabolisme kronis ditandai dengan kadar gula yang tinggi dalam darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid, dan protein sebagai akibat insufisiensi fungsi insulin. Daya kerja insulin akan berkurang dikarenakan gangguan atau defisiensi produksi insulin oleh sel-sel beta langerhans kelenjar pankreas, atau disebabkan oleh kurangnya sensitivitas sel-sel tubuh terhadap insulin.

## 2.4.2 Klasifikasi dari diabetes melitus

### 2.4.2.1 Diabetes tipe 1

Diabetes tipe 1 terjadi karena autoimun dari sel beta pankreas tidak dapat bekerja. Penanda kerusakan kekebalan sel beta ditunjukkan pada saat diagnosis terhadap 90% dari individu dan mencakup sel antibodi, antibodi terhadap asam glutamat dekarboksilase, dan antibodi terhadap insulin. Diabetes tipe 1 dapat terjadi dalam segala usia, mulai dari anak-anak, remaja, hingga orang dewasa. Individu yang lebih muda biasanya memiliki tingkat kerusakan sel beta yang cepat dan dapat terjadi ketoasidosis, sementara orang dewasa dapat mempertahankan sekresi insulin yang cukup untuk mencegah ketoasidosis selama bertahun-tahun, yang sering disebut sebagai laten autoimun diabetes pada orang dewasa.

### 2.4.2.2 Diabetes tipe 2

Diabetes tipe 2 merupakan penyakit hiperglikemik yang ditandai dengan resistensi atau kurangnya sekresi insulin (Dipiro, *et al.*, 2005). Kadar insulin sedikit menurun atau masih dalam rentang normal karena insulin masih dihasilkan di sel beta pankreas, maka diabetes 2 dianggap sebagai *noninsulin dependent diabetes melitus* (NIDDM). Diabetes tipe 2 ini biasanya timbul pada orang yang berumur lebih dari 30 tahun. Penyebab terjadinya diabetes tipe 2 adalah obesitas pada perut, dislipidemia hipertensi, kadar trigliserida tinggi, dan HDL rendah kadar kolesterol dapat menyebabkan resistensi insulin. (Dipiro, *et al.*, 2005). Selain itu, dapat pula dikarenakan faktor genetik yang menyebabkan sel-sel pada beta pankreas menghasilkan insulin yang berbeda atau respon terhadap insulin yang berkurang (Corwin, 2001).

### 2.4.2.3 Diabetes gestational

Diabetes gestational terjadi pada wanita yang sedang hamil yang sebelumnya tidak mengalami diabetes. Sekitar 50% dari wanita pengidap kelainan ini akan kembali ke status nondiabetesnya ketika masa kehamilan berakhir. Namun, terdapat resiko yang lebih besar untuk terkena diabetes di waktu mendatang daripada wanita hamil yang tidak terkena diabetes. Penyebab dari



diabetes gestational berkaitan dengan peningkatan kebutuhan energi dan kadar estrogen dan juga hormon pertumbuhan yang terus menerus meningkat. Hormon pertumbuhan dan estrogen merangsang pengeluaran insulin dan dapat menyebabkan gambaran sekresi berlebihan insulin seperti diabetes tipe 2 dan akhirnya menurunkan responsivitas sel. Hormon pertumbuhan memiliki beberapa efek anti-insulin, misalnya perangsangan glikogenolisis (penguraian glikogen) dan penguraian jaringan lemak. Diabetes gestational dapat memberikan efek samping bagi kehamilan, seperti risiko malformasi kongenital, lahir mati, dan bayi bertubuh besar, yang dapat menimbulkan masalah pada persalinan (Corwin, 2001).

#### 2.4.2.4 Diabetes tipe lain

Selain dari ketiga tipe diabetes yang telah disebutkan, terdapat diabetes tipe lain yaitu disebabkan karena efek genetik fungsi sel beta, efek genetik kerja insulin, penyakit eksokrin pankreas (seperti pankreatitis, neoplasma, hemokromatosis, *cistic fibrosis*, dan pankrestopati fibro kalkulus), endokrinopati, disebabkan karena obat atau bahan kimia, imunologi, sindroma genetik lain, dan juga karena infeksi. (Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2005).

### 2.4.3 Pengobatan Diabetes Melitus

#### 2.4.3.1 Terapi Nonfarmakologi

##### a. Pengaturan diet

Untuk mencapai keberhasilan dalam penatalaksanaan diabetes, penderita harus melakukan pengaturan diet yang baik. Diet yang dianjurkan adalah makanan dengan komposisi yang seimbang dalam hal karbohidrat, protein dan lemak, sesuai dengan kecukupan gizi baik sebagai berikut:

Karbohidrat :60-70%

Protein: 10-15%

Lemak: 20-25%

Pengurangan resistensi insulin dan perbaikan respon sel-sel beta-pankreas dapat dilakukan dengan pengurangan berat badan. Selain itu, makanan juga harus diperhatikan karena makanan dapat mempengaruhi kadar gula dalam darah. Pemberian lemak dari nabati, protein, dan serat sangat diperlukan oleh penderita diabetes untuk mencukupi nutrisi dalam tubuh (Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2005).

#### b. Olah raga

Gerak badan secara teratur (jalan kaki atau bersepeda, olah raga) dapat mengurangi resistensi insulin, sehingga insulin dapat dipergunakan dengan baik oleh tubuh (Tjay dan Rahardja, 2002). Olahraga yang disarankan adalah yang bersifat *CRIPE* (*Continous, Rhythmical, Interval, Progressive, Endurance Training*). Beberapa contoh olahraga yang disarankan antara lain jalan atau lari pagi, bersepeda, berenang, dan lain sebagainya (Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2005).

### 2.4.3.2 Terapi Farmakologi

#### a. Insulin

Mekanisme kerja insulin yaitu menurunkan kadar gula darah dengan menstimulasi pengambilan glukosa perifer dan menghambat produksi glukosa hepatic. Waktu paruh dari insulin pada orang normal sekitar 5-6 menit dan memanjang pada pasien diabetes melitus yang membentuk antibodi terhadap insulin (Sukandar, *et al.*, 2008).

Insulin merupakan obat utama untuk diabetes melitus tipe 1 dan obat untuk beberapa jenis diabetes melitus tipe 2. Saat ini sediaan insulin tersedia dalam bentuk obat suntik yang umumnya dikemas dalam bentuk vial. Penyerapan insulin yang tercepat terjadi di daerah abdomen, daerah lengan, paha bagian atas, dan bokong (Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2005). Preparat insulin dapat dibedakan berdasarkan lama kerja (kerja cepat, sedang, dan panjang).

**Tabel 2.1** Jenis sediaan insulin

<b>Jenis Sediaan Insulin</b>	<b>Mula kerja (jam)</b>	<b>Puncak (jam)</b>	<b>Masa kerja (jam)</b>
Masa kerja Singkat(Shortacting/Insulin), disebut juga insulin reguler	0,5	1-4	6-8
Masa kerja Sedang	1-2	6-12	18-24
Masa kerja Sedang, Mula kerja cepat	0,5	4-15	18-24
Masa kerja panjang	4-6	14-20	24-36

[Sumber : Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2005]

#### b. Sulfonilurea

Mekanisme kerja dari sulfonilurea adalah dengan menstimulasi sel-sel beta dari pulau Langerhans, sehingga sekresi insulin dapat ditingkatkan. Selain itu, kepekaan sel-sel beta bagi kadar glukosa darah juga diperbesar melalui pengaruhnya atas protein transpor glukosa. Sulfonilurea digolongkan atas dua generasi, yaitu generasi pertama (tolbutamida, klorpeopamida, dan tolazamida) dan generasi kedua (glibenklamida, gliklazida, glipizida, dan glikidon). Obat-obat ini sangat bermanfaat untuk penderita diabetes dimana sel-sel beta pankreasnya masih mampu menghasilkan insulin. Sehingga, tidak cocok bagi penderita diabetes dengan sel beta pankreas yang sudah rusak. Efek samping dari sulfonilurea adalah hipoglikemia, gangguan lambung-usus, sakit kepala, pusing, rasa tidak enak dimulut, dan nafsu makan besar sehingga berat badan dapat naik (Tjay dan Rahardja, 2002).

c. Biguanida

Berbeda dengan sulfonilurea, obat-obat ini tidak menstimulasi pelepasan insulin dan tidak menurunkan kadar gula untuk orang sehat. Obat ini juga menekan nafsu makan hingga berat badan tidak meningkat (Tjay dan Rahardja, 2002). Obat hipoglikemik ini bekerja langsung pada hati dan menurunkan produksi glukosa hati (Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2005). Metformin merupakan salah satu obat antidiabetes golongan biguanida yang masih dipakai sebagai obat hipoglikemik oral karena pada dosis normal hanya meningkatkan sedikit kadar asam laktat dalam darah.

d. Tiazolidindion

Troglitazon, rosiglitazon, dan pioglitazon merupakan obat golongan tiazolidindion (Priyanto, 2009). Mekanisme kerja dari golongan tiazolidindion adalah meningkatkan kepekaan bagi insulin dari otot, jaringan lemak, dan hati sehingga penyerapan glukosa ke dalam jaringan lemak dan otot meningkat (Tjay dan Rahardja, 2002).

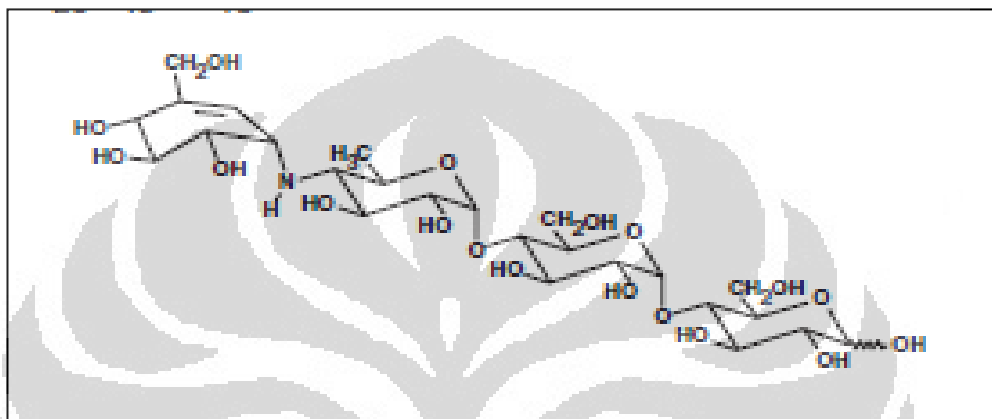
e. Miglitinida

Repaglinida merupakan contoh obat dari miglitinida. Mekanisme kerja dari miglitinida adalah mencetuskan pelepasan insulin dari pankreas segera sesudah makan. Miglitinida harus diminum tepat sesudah makan dan karena reabsorpsinya sangat cepat, maka mencapai kadar darah puncak dalam 1 jam (Tjay dan Rahardja, 2002).

f. Penghambat enzim alfa-glukosidase

Mekanisme kerja dari obat ini adalah menghambat enzim alfa-glukosida dengan menguraikan polisakarida atau oligosakarida (dekstrin atau maltosa) dan sukrosa menjadi glukosa. Hanya karbohidrat dalam bentuk glukosa dan fruktosa yang dapat diabsorpsi, sehingga hambatan peruraian polisakarida atau oligosakarida menjadi glukosa akan menghambat absorpsi glukosa. Akarbose dan miglitol merupakan obat yang dapat menghambat enzim alfa-glukosidase (Tjay dan Rahardja, 2002).

Akarbose merupakan oligosakarida yang berasal dari proses fermentasi mikroorganisme *Actinoplanes utahensis* dan mempunyai rumus kimia O-4,6-dideoxy-4-[[[(1S,4R,5S,6S)-4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-cyclohexen-1-yl]amino]- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucose. Akarbose sangat larut dalam air dan mempunyai pKa 5,1 (RxList Inc, 2008). Akarbose memiliki rumus empiris  $C_{25}H_{43}NO_{18}$  dan struktur kimia sebagai berikut:



[Sumber: RxList Inc, 2008)

**Gambar 2.1** Struktur Kimia Akarbose

## 2.5 Pola Kromatogram

### 2.5.1 Kromatografi Kolom

Kolom kromatografi atau tabung untuk pengaliran karena gaya tarik bumi (gravitasi) atau sistem bertekanan rendah biasanya terbuat dari kaca yang dilengkapi keran jenis tertentu pada bagian bawahnya untuk mengatur aliran pelarut (Gritter, Bobbitt, & Schwarting, 1991). Prinsip kromatografi kolom konvensional adalah partisi dan adsorpsi secara selektif. Komponen kimia akan bergerak berdasarkan pengaruh gaya gravitasi mengikut cairan pengembang karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama. Oleh karena terdapat perbedaan kelarutan tiap-tiap komponen kimia dalam pelarutnya (eluen). Dalam kromatografi kolom terdapat 4 mekanisme pemisahan senyawa, yaitu secara adsorpsi, pertukaran ion, berdasarkan afinitas, dan gel filtrasi (Satyajit, Latif, & Gray, 2006). Pengisian tabung dengan adsorben harus dilakukan dengan hati-hati dan secara merata.

Kromatografi kolom terdiri dari 2 jenis cara pembuatan kolom, yaitu kolom kering dan kolom basah. Pembuatan kolom kering yaitu sebagai berikut:

- a. Selapis pasir dimasukkan kedalam kolom.
- b. Absorben dimasukkan kedalam kolom sedikit demi sedikit. Setiap penambahan dilakukan pemampatan.
- c. Kemudian, kertas saring dimasukkan.
- d. Pelarut dimasukkan dan dibiarkan mengalir ke bawah melalui absorben dengan keran terbuka hingga permukaan pelarut tepat sedikit di atas bagian atas kolom.

Pembuatan kolom basah yaitu sebagai berikut:

- a. Tabung diisi pelarut sepertiga dari kolom. Pelarut yang digunakan mungkin sama dengan dengan pelarut yang akan digunakan untuk memisahkan senyawa alam atau pelarut dengan kepolaran yang lebih rendah. Pelarut tidak boleh lebih polar.
- b. Absorben dibuat lumpuran dengan bagian lain dari pelarut dan lumpuran ini dituangkan kedalam pelarut didalam tabung.
- c. Selama proses pengendapan tabung diketuk-ketuk agar diperoleh lapisan yang seragam.
- d. Lumpuran dapat dimasukkan ke dalam kolom sekaligus atau sedikit demi sedikit (Gritter, Bobbitt, & Schwarting, 1991).

#### 2.5.2 Kromatografi Lapis Tipis (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b).

Kromatografi lapisan tipis digunakan pada pemisahan zat secara cepat dengan menggunakan zat penjerap berupa serbuk halus yang dilapiskan rata pada lempeng kaca. Pemisahan didasarkan pada penjerapan, pembagian, atau gabungannya, tergantung dari jenis zat penjerap dan cara pembuatan lapisan zat penjerap dan jenis pelarut. Kromatografi lapis tipis dengan penjerap penukar ion dapat digunakan untuk pemisahan senyawa polar. Harga  $R_f$  yang diperoleh pada kromatografi lapis tipis, tidak tetap jika dibandingkan dengan yang diperoleh pada kromatografi kertas. Karena itu, pada lempeng yang sama disamping 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. Ukuran dan intensitas bercak dapat digunakan untuk memperkirakan kadar. Penetapan kadar yang lebih teliti dapat dilakukan dengan cara densitometri atau dengan mengambil bercak dengan hati-hati dari lempeng, kemudian disari dengan pelarut yang cocok dan ditetapkan dengan cara spektrofotometri. Kromatografi ini terdiri dari (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b) :

- a. Lempeng kaca: tebal seluruh permukaan lempeng kaca sama, umumnya berukuran 20 x 20 cm, sebagai lempeng tepi digunakan lempeng kaca berukuran 5 cm x 20 cm.
- b. Baki lempeng: umumnya baki lempeng berukuran 122 x 23 cm dengan satu sisi panjang dan satu sisi pendek yang berbingkai untuk menahan lempeng kaca. Baki digunakan untuk meletakkan dan mengatur lempeng kaca pada waktu membuat lapisan zat penjerap hingga diperoleh permukaan yang rata.
- c. Rak penyimpanan. Digunakan untuk tempat lempeng yang telah dilapisi zat penjerap pada waktu pengeringan atau pemindahan. Rak mempunyai ukuran yang cocok sehingga dapat masuk ke dalam lemari pengering. Dapat memuat lebih kurang 10 lempeng dengan jarak tertentu.
- d. Zat penjerap. Terdiri dari zat penjerap kromatografi yang halus. Zat penjerap dapat dilapiskan langsung pada lempeng kaca atau dengan pertolongan zat perekat, misalnya kalsium sulfat
- e. Alat pembuat lapisan. Berbentuk bak panjang yang dibuat dengan teliti, membuat celah memanjang pada dasarnya. Bobot alat sedemikian rupa, sehingga jika digerakkan ke atas lempeng kaca, akan memberikan lapisan zat penyerap pada seluruh permukaan lempeng setebal 0,25 mm.
- f. Bejana kromatografi. Umumnya dapat memuat 2 lempeng kaca dan dapat tertutup rapat
- g. Sablon. Umumnya dibuat dari plastik, digunakan untuk membantu memberikan tanda pada lempeng
- h. Pipet mikro. Pipet mikro berskala 10  $\mu$ l untuk memindahkan cairan.
- i. Alat penyemprot pereaksi. Alat penyemprot yang tahan terhadap pereaksi dan dapat menyemprotkan pereaksi dalam bentuk butir-butir halus.

- j. Pelarut. Larutan pembanding.
- k. Lampu ultraviolet. Lampu ultraviolet yang cocok untuk pengamatan untuk panjang gelombang antara 254 nm hingga 366 nm.

Prosedur pengembangan KLT (Roth & Gottfried, 1988; Griffiths, Alexander, and Renee, 1993):

- a. Larutan uji ditotolkan 2 cm dari bawah dan minimum 2 cm dari sisi pelat sedemikian rupa hingga terjadi noda teratur yang maksimum berdiameter 6 mm
- b. Jika larutan uji yang digunakan lebih dari satu kromatogram, maka noda paling sedikit harus terpisah 1,5 cm dengan totolan lainnya dan terletak secara paralel di bawah pelat.
- c. Setelah penguapan pelarut larutan uji, pelat diletakkan vertikal dalam bejana kromatografi dan titik awal harus berada disebelah atas permukaan fase gerak.
- d. Bejana ditutup dan disimpan pada suhu 20 hingga 25°C.
- e. Jika fase gerak sudah melewati batas yang sudah ditentukan, maka pelat dikeluarkan dari bejana dan dikeringkan.
- f. Setelah, melewati batas yang sudah ditentukan plat disemprotkan dengan pelarut yang sesuai
- g. Hitung nilai Rf

$$R_f = \frac{\text{Jarak perpindahan substansi}}{\text{Jarak perpindahan pelarut}}$$

## 2.6 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia

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).

### a. 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,

**Universitas Indonesia**



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).

#### b. Flavonoid

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

Proses ekstraksi flavonoid dilakukan dengan etanol mendidih untuk menghindari oksidasi enzim (Harborne, 1987). Pendeteksian adanya senyawa ini dapat dilakukan dengan menambahkan larutan aluminium (III) klorida 1% atau  $\text{AlCl}_3$  1% dalam air atau etanol yang menimbulkan warna hijau atau hitam kuat.

#### c. Terpen

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

Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa seperti monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap, diterpen yang sukar menguap dan yang tidak menguap, triterpen, dan sterol. Secara umum terpen larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya terpen diekstraksi dengan menggunakan eter dan kloroform. Saponin dan glikosida jantung merupakan golongan senyawa triterpen atau steroid yang terdapat dalam bentuk glikosida (Harborne, 1987). Senyawa ini biasanya diidentifikasi dengan reaksi Lieberman-Bouchardat (anhidrat asetat- $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) yang memberikan warna hijau kehitaman sampai biru.

#### d. Fenol

Fenol berupa zat warna tanpa warna, tetapi dapat teroksidasi jika terkena udara. Kelarutan dalam air bertambah jika gugus hidroksil makin

banyak, tetapi kelarutan dalam pelarut organik polar umumnya tinggi. Identifikasi untuk fenol menggunakan pereaksi besi (III) klorida 3% (Robinson, 1995)

e. Tanin

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

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

f. Saponin

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

g. 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 sarmantosa, oleandrosa, simarosa dan rutinosa. Sedangkan aglikon (genin) biasanya mempunyai gugus -OH dalam bentuk

alkoholis atau fenolis. Glikosida dapat dibedakan menjadi alfa-glikosida dan beta glikosida. Pada tanaman, glikosida biasanya terdapat dalam bentuk beta glikosida. Kegunaan glikosida bagi tanaman adalah untuk cadangan gula sementara, sedangkan bagi manusia umumnya digunakan untuk obat jantung, diuretika, dan prekursor hormon steroid.

#### h. Kuinon dan Antrakuinon

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

## 2.7 Enzim

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel yang bekerja secara berurutan dan teratur. Enzim mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul nutrien, reaksi yang menyimpan dan mengubah energi kimiawi dan yang membuat makromolekul sel dari prekursor sederhana. Melalui aktivitasnya, sistem enzim terkoordinasi dengan baik menghasilkan suatu hubungan yang harmonis diantara sejumlah aktivitas metabolik yang berbeda, yang diperlukan untuk menunjang kehidupan. Enzim memiliki berat molekul yang berkisar dari kira-kira 12.000 sampai lebih dari 1 juta. Oleh karena itu, enzim berukuran sangat besar dibandingkan dengan substrat atau gugus fungsional targetnya. Beberapa enzim hanya terdiri dari polipeptida dan tidak mengandung gugus kimiawi selain residu asam amino, contohnya adalah ribonuklease pankreas. Enzim memerlukan tambahan komponen kimia bagi aktivitasnya yang disebut dengan kofaktor. Kofaktor merupakan suatu molekul anorganik seperti ion  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , atau  $\text{Zn}^{2+}$ . Beberapa enzim memerlukan koenzim ataupun ion logam untuk aktivitasnya (Lehninger, 1995).

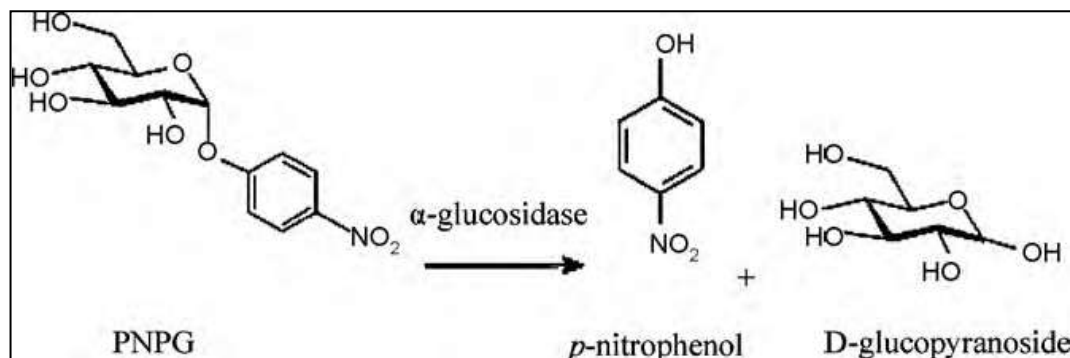
### 2.7.1. Enzim alfa-glukosidase

Enzim alfa-glukosidase merupakan enzim karbohidrase yang terletak pada dinding usus halus yang mengkatalisis pembebasan dari glukosidase dan dari karbohidrat. Penghambatan pada enzim alfa-glukosidase dapat menekan hiperglikemia post prandial. Glukosidase juga terlibat dalam beberapa proses biologi yang penting seperti pada sintesis glikoprotein dan konjugasi dari katabolisme lisosom. Penghambatan alfa-glukosidase secara potensial digunakan sebagai antivirus, antimestatik, imunomodulator, dan agen anti HIV 1. Paling penting penghambatan alfa-glukosidase digunakan dalam manajemen diabetes tipe 2 dan obesitas (Wafu, 2011). Inhibitor alfa-glukosidase merupakan Inhibitor glukosidase telah diusulkan sebagai pengobatan untuk penyakit diabetes melitus tipe 2 karena bekerja dengan mencegah pencernaan karbohidrat. Akarbose dikenal sebagai inhibitor alfa-glukosidase, telah terbukti dapat menghambat peningkatan kadar glukosa darah setelah makan dan hiperglikemia postprandial untuk mengurangi dan hemoglobin glikosidasi (Fatmawati, Shimizu, dan Kondo, 2011).

### 2.7.2 Uji Inhibisi Alfa-Glukosidase

Enzim alfa-glukosidase merupakan sebuah kunci enzim dalam pencernaan karbohidrat di usus kecil. Penghambat alfa-glukosidase dapat menghambat pencernaan karbohidrat dengan mereduksi glukosa post prandial (Lee, *et al.*, 2007).

Reaksi alfa-glukosidase (enzim) dengan karbohidrat (substrat) akan dipecah menjadi disakarida dan oligosakarida, proses ini terjadi pada hidrolisis  $\alpha$ -glukopiranosida, sehingga menghasilkan  $\alpha$ -D-glukosa dari gula non reduksi (Dewi *et al.*, 2007). Pada pengujian *in vitro*, enzim alfa-glukosidase akan menghidrolisis substrat *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida menjadi *p*-nitrofenol (berwarna kuning) dan glukosa dengan reaksi sebagai berikut :



[Sumber:Guo, Ting, Zhi, Wang, 2010]

**Gambar 2.2** Persamaan reaksi enzimatik alfa glukosidase dan *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D glukopiranosida

Aktivitas enzim dapat diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm berdasarkan hasil absorbansi *p*-nitrofenol. Tanaman yang memiliki kemampuan untuk menghambat enzim alfa-glukosidase, *p*-nitrofenol yang dihasilkan akan berkurang (Sugiwati, Setiasih, dan Afifah, 2009; Kikkoman, 2001).

### 2.7.3 Mekanisme Penghambatan Aktivitas Enzim

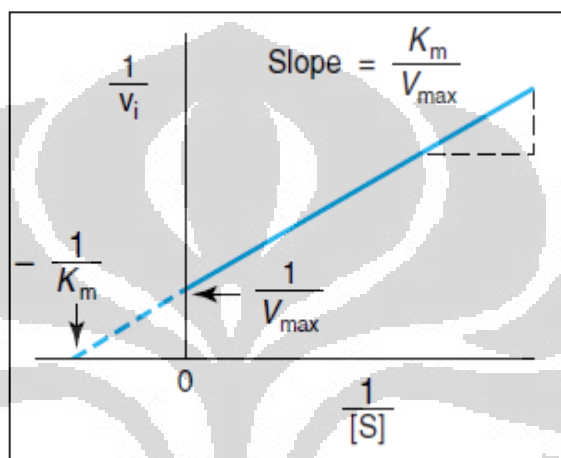
Molekul penghambat aktivitas enzim yang berinteraksi dengan enzim memiliki berbagai macam cara untuk mencegah kerja enzim tersebut. Mekanisme penghambatan aktivitas enzim terdiri dari dua tipe inhibisi yaitu kompetitif dan nonkompetitif.

Kinetika penghambatan enzim membutuhkan substrat yang tinggi untuk mencapai kondisi yang jenuh. Untuk menentukan jenis inhibisi, dilakukan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk sehingga diperoleh tetapan kinetika Michaelis- Menten (Dewi, *et al.*, 2007). Bentuk regresi linier dari Persamaan Michaelis- Menten, (Murray, Granner, & Rodwell, 2009) :

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

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

Persamaan 2.2 merupakan 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 resiprokal-ganda atau Lineweaver-Burk (Gambar 2.3).



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

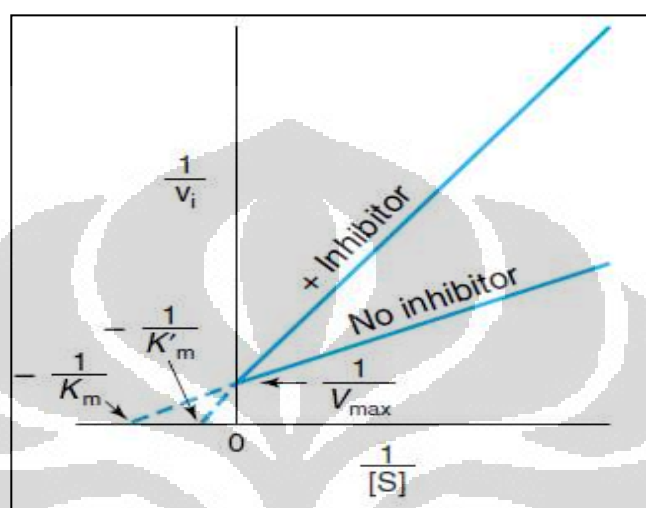
**Gambar 2.3** Plot Resiprokal-Ganda atau Lineweaver-Burk digunakan untuk mengevaluasi Nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$

Metode Lineweaver-Burk digunakan untuk membedakan antara inhibisi kompetitif dan non kompetitif yang berdasarkan pada kemampuan inhibisi penghambat. Metode ini akan menjelaskan mengenai kemampuan penghambatan dapat menghilang atau tidak ketika konsentrasi substrat ditingkatkan.

### 2.7.3.1 Inhibisi kompetitif

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

Untuk inhibisi kompetitif klasik, garis yang menghubungkan titik data eksperimen bertemu di sumbu  $y$  (Gambar 2.4). Karena perpotongan sumbu  $y = 1/V_{max}$ , pola ini menunjukkan bahwa ketika  $1/[S] = 0$ ,  $v_i$  akan sama seperti pada keadaan tanpa penghambat (ekstrak).

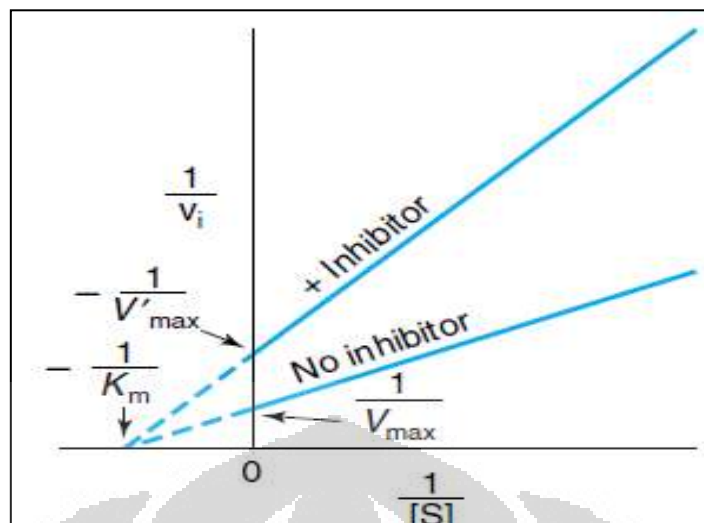


[Sumber : Murray, Granner, & Rodwell, 2009]

**Gambar 2.4** Plot Lineweaver-Burk dari Inhibisi Kompetitif

### 2.7.3.2 Inhibisi non kompetitif

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) (gambar 2.6). Inhibisi non kompetitif yang lebih kompleks terjadi ketika pengikatan *Inhibitor* (I) tidak mempengaruhi afinitas enzim terhadap substrat.



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

**Gambar 2.5** Plot Lineweaver-Burk untuk Inhibisi Non Kompetitif

## 2.8 Spektrofotometer UV-VIS

Spektrum serapan kandungan tumbuhan dapat diukur dalam larutan yang sangat encer dengan pembanding blanko pelarut serta menggunakan spektrofotometer yang merekam otomatis. Senyawa tak berwarna diukur pada jangka 200 sampai 400 nm. Senyawa berwarna diukur pada jangka 200 sampai 700 nm. Panjang gelombang serapan maksimum dan minimum pada spektrum serapan yang diperoleh direkam (dalam nm), demikian juga kekuatan absorbansi pada maksimal dan minimal yang khas. Pengukuran spektrum sangatlah penting pada identifikasi kandungan tumbuhan, yaitu untuk memantau eluat dari kolom kromatografi sewaktu pemurnian dan untuk mendeteksi golongan senyawa tertentu, misalnya poliasetilena, pada waktu penjaringan ekstrak kasar tumbuhan. Pelarut yang banyak digunakan untuk spektroskopi UV ialah etanol 95% karena kebanyakan golongan senyawa larut dalam pelarut tersebut. Alkohol mutlak harus dihindari karena mengandung benzen yang menyerap daerah UV pendek. Pelarut lain yang sering digunakan adalah air, metanol, heksana, eter minyak bumi, dan eter. Pelarut seperti kloroform dan piridina umumnya harus dihindari karena menyerap kuat pada daerah 200-260 nm, tetapi sangat cocok untuk mengukur pigmen tumbuhan, seperti karotenoid di daerah spektrum tampak (Harborne, 1987).



Pengukuran serapan dapat menggunakan hukum Lambert-Beer, yaitu:

$$A = k \cdot c \cdot l$$

Dimana: A= serapan

k= daya serap

c = tebal lapisan zat yang menyerap sinar (cm)

l = kadar (g/L)

(Griffiths, Alexander, and Renee, 1993).

Spektrum serapan adalah hubungan antara serapan dengan panjang gelombang yang biasanya digambarkan dalam bentuk grafik. Untuk mengidentifikasi suatu zat pada daerah ultraviolet pada umumnya dilakukan dengan menggambarkan spektrum serapan larutan zat dalam pelarut, dan dengan kadar yang tertera seperti pada monografi, untuk menetapkan serapan maksimum atau minimum. Spektrum serapan dari zat yang diperiksa kadang-kadang perlu dibandingkan dengan pembanding kimia yang sesuai. Pembanding kimia tersebut dikerjakan dengan cara yang sama dan kondisi yang sama dengan zat yang diperiksa. Blanko digunakan untuk koreksi serapan yang disebabkan pelarut, pereaksi, sel ataupun pengaturan alat. Pengukuran serapan biasanya dilakukan pada panjang gelombang serapan maksimum atau yang tercantum dalam monografi (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995a).

## **BAB 3 METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia, Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, dan Laboratorium Kimia Kuantitatif Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia (FMIPA UI) Depok yang dimulai pada bulan Februari hingga Mei 2012.

### **3.2 Alat**

Lemari pengering, *Freeze-dryer* Scanvac, timbangan analitik, alat giling, *rotary vacuum evaporator* (Janke & Kunkel IKA, Jerman Hotpack), *vaccum oven*, pHmeter (Eutech Instruments), alkoholmeter, spektrofotometer UV-VIS 1601 Shimadzu, kuvet, inkubator *shaker*, lempeng silika gel GF254, kolom kromatografi, mikropipet, alat reflux, pompa vakum, corong pisah, dan alat-alat gelas.

### **3.3. Bahan**

#### **3.3.1. Simplisia**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang kayu tuah yang berasal dari Kebun Raya Bogor dan telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia - Kebun Raya Bogor.

#### **3.3.2. Bahan Kimia**

Enzim alfa-glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* recombinant (Sigma Aldrich, USA), substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) (Sigma Aldrich, USA), dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck, Jerman), *bovine serum albumin* (BSA) (Merck, Jerman), akarbose (Dexa Medica), natrium karbonat (Merck, Jerman), kalium dihidrogenfosfat (Merck, Jerman), etanol, n-heksana, etil asetat, metanol, akuades bebas CO<sub>2</sub>, kloroform, akua demineralisata,

air suling, asam klorida (Merck, Jerman), iodium (Merck, Jerman), kalium iodida (Merck, Jerman), raksa (II), klorida (Merck, Jerman), bismut (III) nitrat (Merck, Jerman), asam nitrat (Merck, Jerman), timbal (II), asetat, natrium sulfat anhidrat (Merck, Jerman), asam asetat anhidrat (Univar, USA), asam sulfat (Merck, Jerman),  $\alpha$ -naftol, serbuk zink (Merck, Jerman), serbuk magnesium (Merck, Jerman), aseton, serbuk asam borat (Merck, Jerman), serbuk asam oksalat (Merck, Jerman), eter, besi (II) klorida, natrium klorida (Mallinckrodt Chemicals, USA), gelatin (Merck, Jerman), natrium hidroksida (Univar, USA), kuersetin (Merck, Jerman), aluminium (III) klorida, silika gel 60, dan silika gel 60H.

### 3.4. Prosedur Pelaksanaan

#### 3.4.1. Rancangan Penelitian

Tahapan-tahapan yang akan dilakukan peneliti diperlihatkan dalam diagram alir penelitian (Lampiran 1) yang terdiri dari:

- a. Penyiapan simplisia
- b. Ekstraksi simplisia
- c. Fraksinasi dengan partisi cair-cair
- d. Uji pendahuluan enzim (penentuan panjang gelombang maksimum, optimasi substrat PNPG, pH dapar fosfat, dan suhu inkubasi)
- e. Uji aktivitas penghambatan alfa glukosidase dari berbagai fraksi hasil partisi cair-cair
- f. Identifikasi golongan senyawa dari fraksi teraktif
- g. Kromatografi kolom
- h. Kromatografi lapis tipis
- i. Uji kinetika penghambatan aktivitas alfa-glukosidase dari fraksi hasil partisi cair-cair
- j. Identifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi yang aktif.

#### 3.4.2. Persiapan Bahan Uji

##### 3.4.2.1 Persiapan Simplisia Uji

Kayu buah (*Antidesma celebicum*. Miq) yang digunakan adalah kulit kayu yang berwarna coklat. Kulit batang kayu buah selanjutnya disortasi, dibersihkan

dari pengotor dan dicuci dengan air mengalir hingga bersih. lalu dikeringkan di udara terbuka dan terlindung dari sinar matahari langsung kemudian dimasukkan ke dalam lemari pengering dan dihitung persentase perbandingan berat kulit batang kering terhadap berat kulit batang segar. Simplisia yang telah kering disortasi kembali untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang tertinggal, kemudian dibuat serbuk dengan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan 40 mesh.

#### 3.4.2.2. Ekstraksi

Serbuk simplisia sebanyak 901,8 g di ekstraksi menggunakan 100 ml etanol 80% dengan cara direfluks selama 1 jam, dilakukan sebanyak 3 kali. Kemudian seluruh ekstrak cair etanol disaring dan diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40-50°C hingga etanol menguap seluruhnya dan menjadi ekstrak kental. Bagan dapat dilihat pada Lampiran 2.

#### 3.4.2.3. Fraksinasi

Ekstrak kental etanol 80% sebanyak 192,5 g difraksinasi menggunakan pelarut yang semakin meningkat kepolarannya yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol. Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi cair-cair menggunakan corong pisah. Sebelum difraksinasi, ekstrak kental etanol didispersikan dengan air hangat terlebih dahulu untuk mempermudah kelarutannya, kemudian dipartisi dengan menambahkan n-heksana dengan perbandingan air dan n-heksana adalah 1:1, dikocok kuat selama  $\pm$  1jam, didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan dengan ekstrak air yang berada di bagian bawah dan n-heksana di bagian atas, selanjutnya keduanya dipisahkan.

Ekstrak n-heksana diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental n-heksana, sedangkan ekstrak air selanjutnya difraksinasi kembali dengan cara yang sama menggunakan pelarut etil asetat dan metanol hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat dan ekstrak kental metanol. Kemudian ekstrak kental n-heksana, etil asetat, dan metanol yang diperoleh ditimbang. Bagan fraksinasi dapat dilihat pada Lampiran 3.

### 3.4.3. Uji pendahuluan

Uji pendahuluan yang dilakukan adalah penentuan konsentrasi substrat, optimasi pH, dan suhu. Hal ini dilakukan untuk mengetahui kondisi yang tepat agar enzim bekerja secara optimal. Pengujian aktivitas penghambatan alfa-glukosidase dilakukan ketika aktivitas enzim paling baik.

#### 3.4.3.1 Pembuatan Larutan Pereaksi Kimia

##### a. Etanol 80%

Etanol 80% dibuat dari etanol 96% sebanyak 800 ml diencerkan dengan akuades sedikit demi sedikit disertai dengan pengecekan menggunakan alkoholmeter. Penambahan akuades dilakukan terus menerus hingga alkoholmeter mencapai angka 80.

##### b. Asam Klorida 2 N

Larutan asam klorida 2 N dibuat dengan melarutkan 10 g NaOH dengan akuades secukupnya hingga 100 ml.

##### c. Asam Nitrat 0,5 N

Pembuatan larutan ini dengan melarutkan 3,15 g  $\text{HNO}_3$  dalam 100 ml akuades.

##### d. Natrium Hidroksida 0,1 N

Larutan ini dibuat dengan melarutkan 4 g NaOH dengan akuades secukupnya hingga 100 ml.

##### e. Natrium Hidroksida 2 N

Larutan ini dibuat dengan melarutkan 4 g NaOH dengan akuades secukupnya hingga 100 ml.

f. Natrium Hidroksida 10%

Larutan ini dibuat dengan melarutkan 10 g NaOH dengan akuades secukupnya hingga 100 ml.

g. Larutan timbal (II) asetat 0,4 M

Larutan ini dibuat dengan cara melarutkan 18,976 g timbal (II) asetat dalam 100 ml akuades.

h. Larutan pereaksi Mayer

Larutan pereaksi Mayer dibuat dengan mencampurkan larutan raksa (II) klorida dengan larutan kalium iodida. Kedua larutan tersebut dicampurkan dan dicukupkan volumenya dengan akuades hingga 100 ml.

i. Larutan pereaksi Dragendorf

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

j. Larutan pereaksi Bouchardat

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

k. Larutan pereaksi Mollisch

Larutan pereaksi Mollisch dibuat dengan cara melarutkan 1,50 g  $\alpha$ -naftol P dalam 50 ml metanol 0,5 N.

l. Larutan kalium dihidrogenfosfat 0,1 M

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

m. Larutan Bovin Serum Albumin (BSA)

Masing-masing sejumlah 200 mg BSA dilarutkan dalam 100 ml dapar fosfat (pH 6,6; 6,8; dan 7,0).

n. Larutan Enzim Alfa-Glukosidase

Prosedur pembuatan larutan enzim yaitu dengan melarutkan 10,1 mg alfa-glukosidase dalam 100 ml dapar fosfat (pH 6,6; 6,8; dan 7,0) yang mengandung 200 mg *bovine serum albumin* dan diperoleh larutan induk enzim sebesar 0,45 U/ml. Kemudian, diencerkan dengan dapar fosfat (pH 6,6; 6,8; dan 7,0) hingga diperoleh larutan enzim dengan konsentrasi 0,15 U/ml (Sigma, 1996).

o. Larutan Substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) 20 mM

Pembuatan larutan substrat dilakukan dengan cara melarutkan 60,25 mg p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida kedalam 100 ml akuades bebas CO<sub>2</sub> hingga didapatkan substrat dengan konsentrasi 20 mM. Larutan substrat konsentrasi 20 mM diencerkan hingga didapatkan konsentrasi substrat 20; 10; 5; 2,5; 2; dan 1 mM.

p. Larutan Substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) 30 mM

Pembuatan larutan substrat dilakukan dengan cara melarutkan 90,375 mg p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida kedalam 100 ml aquades bebas CO<sub>2</sub> hingga didapatkan substrat dengan konsentrasi 30 mM. Larutan substrat konsentrasi 30 mM diencerkan hingga didapatkan konsentrasi substrat 30 dan 15 mM.

q. Larutan Dapar Fosfat (pH 6,6)

Prosedur pembuatan dapar kalium fosfat 0,1 M yaitu mencampurkan larutan 50,0 ml kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,1 M dengan kurang lebih 16,4 ml natrium hidroksida ( $\text{NaOH}$ ) 0,1 N dan diencerkan dengan air bebas  $\text{CO}_2$  hingga 200 ml (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979).

r. Larutan Dapar Fosfat (pH 6,8)

Prosedur pembuatan dapar kalium fosfat 0,1 M yaitu mencampurkan larutan 50,0 ml kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,1 M dengan kurang lebih 22,4 ml natrium hidroksida ( $\text{NaOH}$ ) 0,1 N dan diencerkan dengan air bebas  $\text{CO}_2$  hingga 200 ml (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979).

s. Larutan Dapar Fosfat (pH 7,0)

Prosedur pembuatan dapar kalium fosfat 0,1 M yaitu mencampurkan larutan 50,0 ml kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,1 M dengan kurang lebih 29,1 ml natrium hidroksida ( $\text{NaOH}$ ) 0,1 N dan diencerkan dengan air bebas  $\text{CO}_2$  hingga 200 ml (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979).

t. Larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  200 mM

Sebanyak 21,2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 1000 ml air suling.

#### 3.4.3.2 Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan dimetil sulfoksida (DMSO) sebanyak 5  $\mu\text{l}$  ditambahkan 245  $\mu\text{l}$  larutan dapar fosfat pH 6,8 dan 125  $\mu\text{l}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida dengan konsentrasi 10 mM, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, ke dalam campuran ditambahkan 125  $\mu\text{l}$  larutan enzim dengan konsentrasi yang telah ditentukan, lalu diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1000  $\mu\text{l}$  natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 200 mM. Campuran diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis.



**Tabel 3.1** Penentuan panjang gelombang maksimum

Reagen	Volume ( $\mu\text{l}$ )	
	Uji	Kontrol
DMSO	5	5
Dapar fosfat (pH 6,8)	245	245
Substrat (10 mM)	125	125
<b>Diinkubasi dengan suhu 37<sup>0</sup>C, 5 menit</b>		
Enzim	125	-
Natrium karbonat 200 mM	-	1000
<b>Diinkubasi dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama 15 menit</b>		
Enzim	-	125
Natrium karbonat 200 mM	1000	-
<b>Diukur absorbansi dan ditentukan panjang gelombang maksimum</b>		

Total volume larutan: 1,5 ml

#### 3.4.3.3 Optimasi konsentrasi substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG)

Larutan dimetil sulfoksida (DMSO) sebanyak 5  $\mu\text{l}$  ditambahkan 245  $\mu\text{l}$  larutan dapar fosfat pH 6,8 dan 125  $\mu\text{l}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (30; 20; 15; 10; 5; 2,5; 2; dan 1 mM), campuran diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C. Setelah inkubasi, ke dalam campuran ditambahkan 125  $\mu\text{l}$  larutan enzim dengan konsentrasi yang telah ditentukan, campuran diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1000  $\mu\text{l}$  natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 200 mM. Campuran diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

**Tabel 3.2** Prosedur optimasi konsentrasi substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG)

Reagen	Volume ( $\mu$ l)	
	Uji	Kontrol
DMSO	5	5
Dapar fosfat (pH 6,8)	245	245
Substrat (30; 20; 15; 10; 5; 2,5; 2; dan 1 mM)	125	125
<b>Diinkubasi dengan 37<sup>0</sup>C, 5 menit</b>		
Enzim	125	-
Natrium karbonat 200 mM	-	1000
<b>Diinkubasi dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama 15 menit</b>		
Enzim	-	125
Natrium karbonat 200 mM	1000	-
<b>Diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum</b>		

Total volume larutan: 1,5 ml

#### 3.4.3.4 Optimasi pH dapar fosfat

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 5  $\mu$ l dimetil sulfoksida (DMSO), 245  $\mu$ l dapar fosfat (pH 6,6; 6,8; 7,0) dan 125  $\mu$ l p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimal, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C. Untuk larutan uji, ditambahkan 125  $\mu$ l larutan enzim, selanjutnya diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 1000  $\mu$ l 200 mM natrium karbonat. Selanjutnya, p-nitrofenol yang dihasilkan dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

**Tabel 3.3** Prosedur optimasi pH dapar fosfat

Reagen	Volume ( $\mu$ l)	
	Uji	Kontrol
DMSO	5	5
Dapar fosfat (pH 6,6/6,8/7,0)	245	245
Substrat (konsentrasi optimal)	125	125
<b>Diinkubasi 37°C, 5 menit</b>		
Enzim	125	-
Natrium karbonat 200 Mm	-	1000
<b>Diinkubasi 37°C, 15 menit</b>		
Enzim	-	125
Natrium karbonat 200 mM	1000	-
<b>Ukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum</b>		

Total volume larutan: 1,5 ml

#### 3.4.3.5 Optimasi Suhu Inkubasi

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 5  $\mu$ l dimetil sulfoksida (DMSO), 245  $\mu$ l dapar fosfat dengan pH optimal dan 125  $\mu$ l 5 mM p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG), lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Untuk larutan uji, ditambahkan 125  $\mu$ l larutan enzim dengan konsentrasi yang telah ditentukan dan selanjutnya diinkubasi selama 15 menit pada suhu 30, 37, dan 40°C. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 1000  $\mu$ l 200 mM natrium karbonat. Selanjutnya, p-nitrofenol yang dihasilkan dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Untuk larutan kontrol ditambahkan natrium karbonat terlebih dahulu sebelum ditambahkan enzim.

**Tabel 3.4** Prosedur optimasi suhu inkubasi

Reagen	Volume (µl)	
	Uji	Kontrol
DMSO	5	5
Dapar fosfat (pH optimal)	245	245
Substrat (konsentrasi optimal)	125	125
<b>Diinkubasi 30°, 37°, 40° C, 5 menit</b>		
Enzim	125	-
Natrium karbonat 200 mM	-	1000
<b>Diinkubasi 30°, 37°, 40° C, 15 menit</b>		
Enzim	-	125
Natrium karbonat 200 mM	1000	-
<b>Ukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum</b>		

Total volume larutan: 1,5 ml.

#### 3.4.3.6 Perhitungan Aktivitas Enzim (Kikkoman)

$$\text{Volume aktivitas ( U / ml )} = \frac{A_{\text{uji}} - A_{\text{blanko}} \times V_{\text{campuran}} \text{ (ml)} \times df}{18,1 \times V_{\text{sampel}} \text{ (ml)} \times \text{waktu inkubasi (menit)}} \quad (3.1)$$

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

Keterangan :

V = Volume total (ml)

df = faktor pengenceran

18.1 = Ekstinsi milimolar p-Nitrophenol pada 400 nm

V<sub>e</sub> = Volume enzim (ml)

t = Waktu inkubasi (menit)

C = Banyaknya alfa-glukosidase dalam larutan (mg/ml)

#### Definisi Unit:

Satu unit akan melepaskan 1,0 µmol D-glukosa dari p-nitrofenil α-D-glukosida per menit pada pH 6,8 dan suhu 37°C.

#### 3.4.4. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Alfa-Glukosidase (Dewi, *et al.*, 2007; Sugiwati, Setiasih, & Afifah., 2009)

Uji aktivitas penghambatan enzim alfa-glukosidase dilakukan sesuai dengan kondisi optimasi yang diperoleh. Prosedur penentuan aktivitas penghambatan alfa-glukosidase :

##### 3.4.4.1. Penyiapan Larutan Akarbose

Akarbose ditimbang sebanyak 200 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml dan di ad dengan dapar fosfat pH optimal hingga diperoleh konsentrasi larutan standar 1%. Larutan standar 1% diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar 0,5; 0,25 ; 0,125; 0,0625; dan 0,03175 %.

##### 3.4.4.2. Penyiapan Larutan Kuersetin

Kuersetin ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 ml dan di ad dengan dapar fosfat pH optimal hingga diperoleh konsentrasi larutan standar 1%. Larutan standar 1% diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar 0,5; 0,25 ; 0,125; 0,0625; dan 0,03175 %.

##### 3.4.4.3. Pernyiapan Larutan Sampel

Ekstrak ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dalam 2 hingga 10 ml DMSO kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 ml dan di ad dengan dapar fosfat pH optimal hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 1%. Larutan ekstrak 1% diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; dan 0,03175%.

##### 3.4.4.4. Pengujian Blanko (B)

Sebanyak 5 µl larutan dimetil sulfoksida (DMSO) ditambah dengan 245 µl dapar fosfat pH optimal dan 125 µl p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimal, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam larutan ditambahkan 125 µl larutan enzim, kemudian sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 1000 µl 200 mM natrium karbonat. Sampel diukur absorbansinya dengan

spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

#### 3.4.4.5. Pengujian Kontrol

Dimetil sulfoksida sebanyak 5 µl larutan ditambah dengan 245 µl dapar fosfat pH optimal dan 125 µl p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimal, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam larutan ditambahkan 1000 µl 200 mM natrium karbonat. Sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 125 µl larutan enzim. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

#### 3.4.4.6. Pengujian Blanko Sampel (BS)

Sampel atau ekstrak sebanyak 5 µl ditambah dengan 245 µl dapar fosfat pH optimal dan 125 µl p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi yang diperoleh pada saat optimasi, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam larutan sampel ditambahkan 125 µl larutan enzim, kemudian diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 1000 µl 200 mM natrium karbonat. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

#### 3.4.4.7. Pengujian Kontrol Sampel (KS)

Sampel (ekstrak) sebanyak 5 µl ditambah dengan 245 µl dapar fosfat (pH optimal) dan 125 µl p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimal, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam larutan sampel ditambahkan 1000 µl 200 mM natrium karbonat dan inkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 125 µl larutan enzim. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

#### 3.4.4.8. Uji Standar Akarbose dan Kuersetin

Sebanyak 5  $\mu$ l larutan akarbose dan kuersetin ditambah dengan 245  $\mu$ l dapar fosfat pH yang telah ditentukan dan 125  $\mu$ l p-Nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG), diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam sampel ditambahkan 125  $\mu$ l enzim yang telah diencerkan, sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 1000  $\mu$ l 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali. Persentase inhibisi dihitung setiap konsentrasi akarbose dan IC<sub>50</sub> akarbose.

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

$$\% \text{ inhibisi} = \left\{ \frac{c-s}{c} \right\} \times 100 \quad (3.3)$$

Keterangan: S = absorbansi sampel (BS-KS)

C = absorbansi kontrol (DMSO), (Kontrol-Blanko)

IC<sub>50</sub> dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Dari persamaan:  $y = a + bx$  dapat dihitung nilai IC<sub>50</sub> dengan menggunakan rumus :

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

#### 3.4.5 Uji Kinetika Penghambatan Enzim (Dewi, *et al.*, 2007)

Konsentrasi p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida ditingkatkan untuk menguji kinetika penghambatan enzim. Pengujian ini menggunakan ekstrak dengan fraksi aktif yang memiliki aktivitas penghambatan enzim tertinggi pada uji aktivitas penghambatan enzim. Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten (Dewi, *et al.*, 2007).

Tetapan kinetika Michaelis-Menten dihitung berdasarkan persamaan regresi  $y = a + b x$ , dimana x adalah  $1/[S]$  dan y adalah  $1/A$ . Jenis inhibisi dapat

juga dilihat dari bentuk plot Lineweaver-Burk (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).

**Tabel 3.5** Prosedur penentuan kinetika penghambatan enzim

Reagen	Volume ( $\mu$ l)	
	Tanpa Inhibitor	Dengan Inhibitor
Ekstrak	-	5
DMSO	5	-
Dapar (pH optimal)	245	245
Substrat (konsentrasi optimal)	125	125
Inkubasi penangas air 37°C selama 5 menit		
Enzim	125	125
Inkubasi penangas air suhu optimum selama 15 menit		
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1000	1000
<b>Ukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum</b>		

Total larutan yang dibuat: 1,5 ml

### 3.4.6 Kromatografi Kolom

Ekstrak yang memiliki aktivitas terbesar (fraksi aktif) ditimbang, kemudian dibuat sebagai larutan uji yang akan dianalisis dengan kromatografi kolom. Untuk menghasilkan fraksi yang aktif umumnya dibuat sampel dengan metode kering. Kolom yang digunakan dalam pemisahan adalah kromatografi kolom dipercepat. Eluen harus dapat memisahkan senyawa dari sampel dengan baik. Oleh, karena itu eluen dipilih dari pola pemisahan yang baik pada kromatografi lapis tipis. Prosedur kerja kromatografi kolom dipercepat:

- Sampel atau ekstrak kental sebanyak 20 g, kemudian dilarutkan dengan pelarut, lalu silika gel yang kasar ditambahkan dan diaduk hingga ekstrak kental menjadi kering.
- Silika gel kering dimasukkan kedalam kolom, dipadatkan dengan menggunakan vakum. Kemudian kertas saring dimasukkan.
- Solven dimasukkan kedalam kolom, kemudian sampel kering dimasukkan.



- d. Eluen n-heksana:etil asetat = 100:0; 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30; 65:35; 60:40; 50:50; 40:60; 30:70; 20:80; dan 10:90 masing-masing ditambahkan.
- e. Eluen etil asetat:metanol = 100:0; 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30; 65:35; 60:40; 50:50; 40:60; 30:70; 20:80; 10:90; dan 0:100 masing-masing ditambahkan.

#### 3.4.7 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi dilakukan untuk mengetahui profil KLT fraksi gabungan yang didapat dari hasil kolom. Umumnya dibuat kromatogram pada lempeng silika gel dengan berbagai jenis fase gerak sesuai dengan golongan kandungan kimia sebagai sasaran analisis (Gritter, Bobbitt, & Schwarting, 1991).

KLT yang akan digunakan sebaiknya dilihat fluoresensinya pada panjang gelombang 254 nm. Jika tidak berfluoresensi pada panjang gelombang 254 nm, sebaiknya dibiarkan selama 30 menit atau lebih pada suhu kamar dan diaktifkan dengan cara dipanaskan dalam oven selama 1 jam dengan suhu 110<sup>0</sup>C. Pelarut yang digunakan dalam KLT sebaiknya digunakan hanya satu kali pengembangan saja sebab susunannya mudah berubah akibat salah satu komponennya sudah menguap. Bejana pada kromatografi dilakukan penjemuran terlebih dahulu sebelum lempeng KLT dimasukkan. Hal ini akan memperkecil penguapan pelarut dan akan menghasilkan bercak yang lebih bundar dan lebih baik. Kertas saring dapat digunakan untuk mempercepat penjemuran bejana (Gritter, Bobbitt, & Schwarting, 1991). Prosedur pengujian dengan KLT (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b) :

- a. Eluen dimasukkan kurang lebih 10 ml ke dalam bejana kromatografi hingga tinggi pelarut 0,5 cm sampai 1 cm, ditutup rapat, biarkan sistem mencapai keseimbangan. Eluen yang digunakan adalah n-heksana:etilasetat = 8:2 dan butanol:asam asetat:air = 4:1:5
- b. Lempeng KLT ditotolkan terpisah dengan jarak lebih kurang 1,5 cm antara larutan zat yang diperiksa

- c. Lempeng dimasukkan kedalam bejana yang telah dijenuhkan, hingga tempat penotolan terletak disebelah bawah. Pelarut yang ada didalam bejana harus mencapai tepi bawah lapisan lempeng, tempat penotolan tidak boleh terendam.
- d. Bejana ditutup rapat dan dibiarkan hingga pelarut merambat hingga mencapai batas yang telah ditentukan (kurang lebih 0,2 cm dibawah batas atas lempeng).
- e. Pelarut telah mencapai batas yang telah ditentukan, kemudian lempeng dikeringkan dengan cara diangin-anginkan
- f. Bercak diamati dengan sinat ultraviolet panjang gelombang 365 nm.

### 3.4.8 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia

#### 3.4.8.1 Identifikasi alkaloid (Departemen Kesehatan Republik Indonesia., 1995b)

10 mg ekstrak ditambahkan 1 ml HCl 2N dan 9 ml air, dipanaskan dalam penangas air selama 2 menit, didinginkan. Kemudian disaring dan ditampung filtrat (filtrat a). Filtrat a digunakan sebagai larutan percobaan selanjutnya. Hasil identifikasi ekstrak dibandingkan dengan standard yaitu *Chinae cortex*.

- a. 1 ml filtrat a diambil, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat, terbentuk endapan coklat sampai dengan hitam (positif alkaloid).
- b. 1 ml filtrat a diambil, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol (positif alkaloid).
- c. 1 ml filtrat a diambil, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes Pereaksi Dragendorf, terbentuk endapan jingga coklat (positif alkaloid).

Selain itu, identifikasi alkaloid dapat dilakukan dengan kromatografi lapis tipis. Untuk fraksi etil asetat dan fraksi hasil kolom teraktif (fraksi E) dapat dilakukan identifikasi alkaloid dengan kromatografi lapis tipis menggunakan eluen kloroform:metanol = 85:15 (Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984). Deteksi alkaloid menggunakan pereaksi Dragendorf. Hasil positif jika terdeteksi warna coklat-orange. Hasil deteksi dibandingkan standar yaitu *Chinae cortex*.

#### 3.4.8.2 Identifikasi flavonoid (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b)

10 mg ekstrak ditambahkan 4 ml etanol 95% hingga ekstrak larut (larutan

b). Hasil identifikasi ekstrak dibandingkan dengan standard yaitu daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*).

- a. 2 ml larutan b diambil, ditambahkan 0,5 gram serbuk seng, kemudian ditambahkan 2 ml HCl 2N, didiamkan 1 menit. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat P. Kocok perlahan, kemudian didiamkan 2-5 menit. Terbentuk warna merah intensif (positif flavonoid).
- b. 2 ml larutan b diambil, ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat P. Kocok perlahan. Terbentuk warna merah jingga hingga merah ungu (positif flavonoid) atau kuning jingga (flavon, kalkon, auron).

Deteksi flavonoid fraksi etil asetat dan hasil fraksi E dengan KLT menggunakan eluen butanol:etil asetat:air = 40:10:50 (Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984). Deteksi dengan pereaksi flavonoid. Hasil positif jika terdeteksi warna kuning dibawah sinar ultraviolet pada panjang gelombang 365 nm.. Hasil deteksi dibandingkan dengan standar yaitu *Orthosiphonis folium*.

#### 3.4.8.3. Identifikasi sterol/terpen (Farnsworth, 1966)

10 ekstrak digunakan untuk reaksi Liberman-Bouchard : 5 ml larutan eter diuapkan di dalam cawan penguap, ke dalam residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat, kemudian 1 tetes asam sulfat pekat. Filtrat mengandung sterol/terpen apabila terbentuk warna merah-hijau-violet-biru. Hasil identifikasi ekstrak dibandingkan dengan standar yaitu *Caryophili flos*.

Identifikasi terpen fraksi etil asetat dan hasil fraksi E dengan KLT menggunakan eluen benzena:etil asetat = 90:10. Deteksi dengan pereaksi vanillin dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% yang dilarutkan dalam metanol. Hasil positif jika terdeteksi warna ungu. Hasil dibandingkan dengan standar *Caryophili flos* (Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984).

#### 3.4.8.4. Deteksi polifenol (Robinson, 1995)

Deteksi polifenol fraksi etil asetat dan fraksi E dengan KLT menggunakan eluen butanol:asam asetat:air = 40:10:50. Deteksi dengan  $\text{FeCl}_3$  3%. Hasil positif jika terdeteksi warna hitam (Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984). Hasil identifikasi ekstrak dibandingkan dengan standar yaitu teh (*Camellia sinensis*).

#### 3.4.8.5 Identifikasi tanin (Farnsworth, 1966)

Identifikasi tanin dilakukan dengan penambahan 10 mg ekstrak, kemudian ditambahkan 15 ml air panas. Lalu, dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit dan disaring. Kemudian ditambahkan dengan 3 tetes gelatine, sehingga menghasilkan endapan putih. Hasil identifikasi ekstrak dibandingkan dengan standar yaitu teh (*Camellia sinensis*).

#### 3.4.8.6. Identifikasi saponin (Departemen Kesehatan Republik Indonesia., 1995b)

10 mg ekstrak ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik, kemudian didiamkan selama 10 menit. Terbentuk buih yang mantap setinggi 1 hingga 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang. Hasil identifikasi ekstrak dibandingkan dengan standar yaitu *Liquiritae radix*.

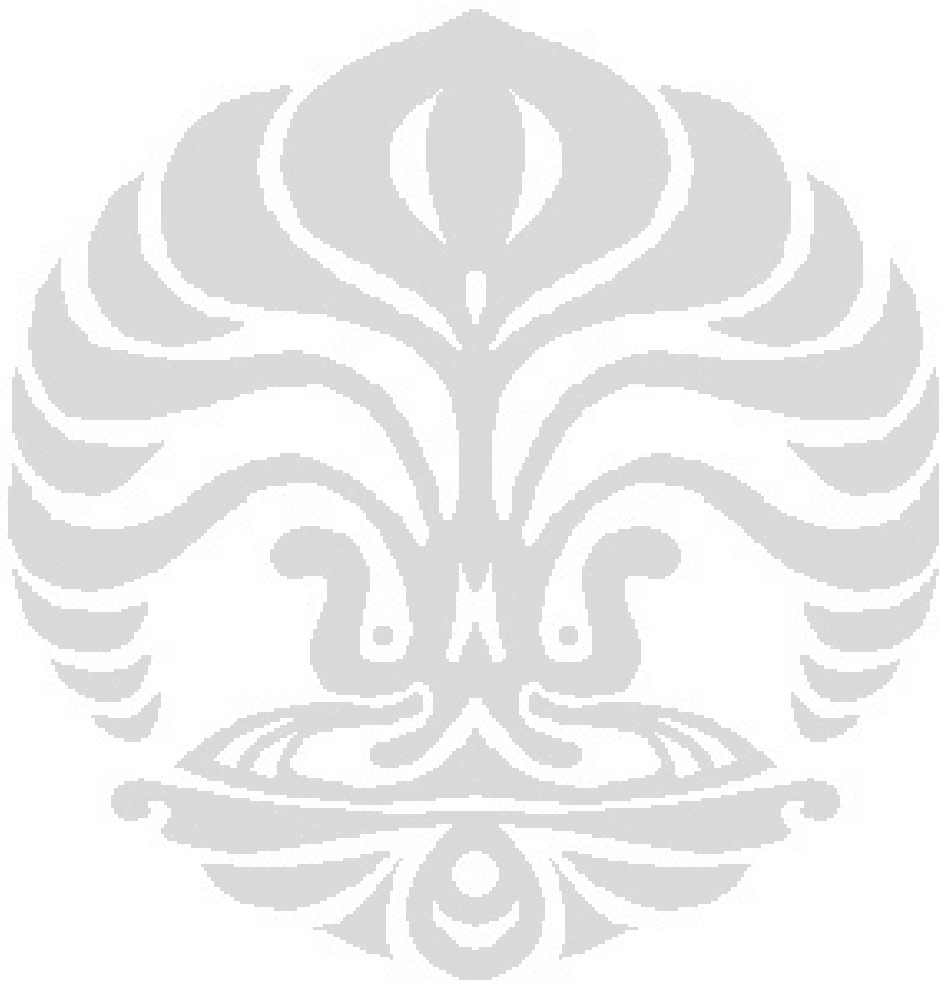
Deteksi saponin fraksi etil asetat dan fraksi E dengan KLT menggunakan eluen butanol:etil asetat:air = 50:10:40. Deteksi dengan vanillin dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1% yang dilarutkan dalam metanol (Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984). Hasil positif jika terdeteksi warna biru-biru ungu. Hasil dibandingkan dengan standar *Liquiritae radix*.

#### 3.4.8.7. Identifikasi gula (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b)

10 mg ekstrak ditambahkan etanol 80% P sebanyak 5 ml diuapkan diatas penangas air, 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). Hasil dibandingkan dengan standar yaitu *Nerii folium*.

3.4.8.8. Deteksi kuinon dan antrakuinon (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b)

Deteksi kuinon ekstrak etanol 80%, fraksi etil asetat, dan fraksi E dengan KLT menggunakan eluen etil asetat:metanol:air = 100:17:13. Deteksi dengan vanillin dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%. Hasil positif jika terdeteksi warna ungu (Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984). Hasil dibandingkan dengan standar yaitu *Rei radix*.



## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Persiapan Bahan Uji**

##### **4.1.1 Persiapan Simplisia Uji**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang kayu tuah. Tanaman ini diperoleh dari Kebun Raya Bogor dan telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Kebun Raya Bogor. Determinasi dilakukan untuk memberikan keterangan bahwa tanaman tersebut adalah kulit batang kayu tuah yang berasal dari Kebun Raya Bogor. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 11. Kulit batang yang diperoleh dari batang yang masih segar, berwarna coklat, dan diameternya kurang lebih 2 cm, sehingga dapat diambil kulitnya dengan mudah. Pohon kayu tuah dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan batang kayu tuah dapat dilihat pada Gambar 4.4.

Batang tanaman kayu tuah dikumpulkan, disortasi, dibersihkan dari pengotor, dan dikuliti. Kulit batang kayu tuah yang telah diperoleh ditimbang. Berat kulit batang kayu tuah yang masih segar adalah 3,7 kg. Pada penelitian ini pengeringan dilakukan di Kebun Raya Bogor dengan menggunakan alat pengering. Berat kulit batang kayu tuah yang telah dikeringkan adalah 1,7 kg, kemudian dihitung persentase penyusutan bobot simplisia kulit batang kayu tuah setelah dikeringkan. Hasil dapat dilihat pada Tabel 4.4. Lalu, simplisia kering digiling untuk memperluas permukaan serbuk sehingga dapat menyari komponen dalam serbuk lebih banyak. Kemudian, serbuk kulit batang kayu tuah ditimbang dengan tujuan untuk menghitung jumlah rendemen yang dihasilkan dan disimpan dalam wadah.

##### **4.1.2 Ekstraksi**

Metode ekstraksi yang dilakukan yaitu dengan refluks. Serbuk simplisia yang digunakan sebanyak 901,8 g. Metode ini dilakukan selama 1 jam dan suhu yang digunakan tidak lebih dari 70<sup>0</sup>C. Penggunaan suhu ini bertujuan agar senyawa yang diinginkan tidak terurai. Kemudian, filtrat dipisahkan dari ampas

dengan proses penyaringan. Proses ekstraksi ini dilakukan sebanyak tiga kali untuk mendapatkan senyawa yang lebih banyak. Kemudian, pelarut diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan suhu tidak lebih dari 50°C. Suhu yang digunakan juga tidak boleh terlalu tinggi karena dikhawatirkan akan merusak senyawa yang terdapat dalam simplisia. Penguapan dilakukan untuk menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang dihasilkan kemudian ditimbang untuk mendapatkan rendemen. Hasil rendemen dapat dilihat dalam Tabel 4.5.

Pelarut yang digunakan adalah yang berkhasiat atau aktif sehingga, senyawa yang diinginkan dapat terpisah dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, dan ekstrak hanya mengandung sebagian senyawa kandungan yang diinginkan (Depkes, RI, 2000). Dalam penelitian ini digunakan pelarut etanol 80%. Etanol merupakan pelarut yang dapat menyari komponen kimia baik yang bersifat polar maupun nonpolar (Harborne, 1987). Perbandingan antara air dan etanol yang sesuai akan memfasilitasi difusi bahan terekstraksi keluar sel (Harborne, 1987; Samuelsson, 1999). Oleh karena itu, digunakan etanol 80% sehingga senyawa yang diinginkan dapat tersari dengan baik. Bagan kerja ekstraksi dapat dilihat pada Lampiran 4.

#### 4.1.3 Fraksinasi

Fraksinasi yang digunakan adalah fraksinasi cair-cair dengan partisi dalam corong pisah. Partisi ini digunakan untuk efisiensi waktu. Ekstrak kental etanol 80% sebanyak 192,65 g didispersikan dengan air hangat, kemudian diaduk hingga homogen. Setelah larut, ekstrak air tersebut di masukan kedalam corong pisah dan ditambahkan n-heksana dengan perbandingan 1:1, dikocok selama  $\pm 15$  menit. Pengocokan yang kuat akan terbentuk busa dan emulsi yang akan mengganggu dalam proses partisi. Setelah pengocokan, partisi didiamkan hingga terbentuk dua lapisan dengan ekstrak air yang berada dibagian bawah dan lapisan n-heksana berada dibagian atas, Selanjutnya, lapisan n-heksana dipisahkan dari ekstrak air. Lapisan n-heksana yang terbentuk berada dibagian atas karena berat jenis dari n-heksan lebih kecil dibandingkan air. Partisi dengan n-heksana dilanjutkan hingga warna lapisan n-heksana berubah dari warna hijau menjadi putih transparan.

Ekstrak n-heksana diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental n-heksana, sedangkan ekstrak air selanjutnya difraksinasi kembali dengan cara yang sama menggunakan pelarut etil asetat hingga didapat ekstrak kental etil asetat. Lapisan air yang terakhir dihilangkan etil asetatnya dan di masukkan kedalam *freeze dry* sehingga didapatkan serbuk. Kemudian, serbuk tersebut diteteskan dengan metanol, sehingga terbentuk ekstrak metanol. Ekstrak kental n-heksana, etil asetat, dan metanol disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C. Berat fraksi partisi cair-cair dapat dilihat pada Tabel 4.6 Pemilihan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol berdasarkan dari tingkat kepolaran masing-masing pelarut.

## 4.2 Uji Pendahuluan

Sebelum melakukan uji aktivitas antidiabetes pada ekstrak kulit batang kayu tuah, dilakukan uji pendahuluan yaitu penentuan panjang gelombang maksimum, optimasi substrat, optimasi pH dapat fosfat dan optimasi suhu inkubasi. Uji ini dilakukan untuk mendapatkan aktivitas enzim yang optimal. Aktivitas enzim yang digunakan adalah 0,15 U/mg (Elya, *et al.*, 2012).

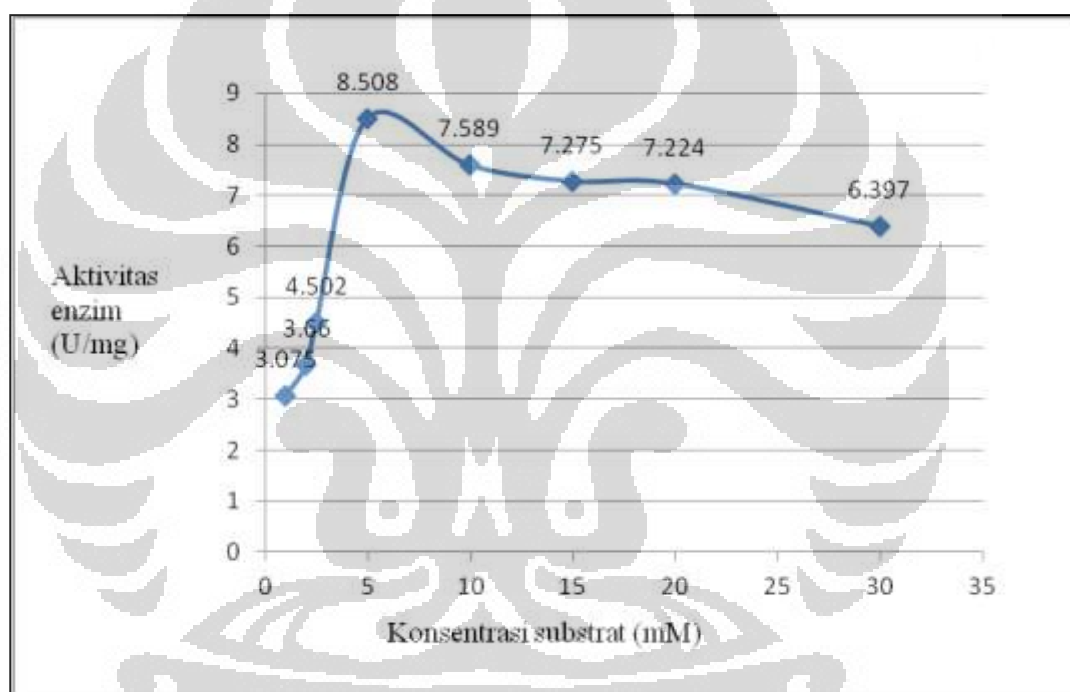
### 4.2.1 Penentuan panjang gelombang maksimum

Penambahan DMSO sebagai kontrol dalam menentukan panjang gelombang maksimum. Jumlah DMSO yang ditambahkan sebanyak 5 µl, kemudian ditambah dengan 245 µl dapar fosfat pH 6,8 dan 125 µl p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) konsentrasi 10 m, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam larutan ditambahkan 125 µl larutan enzim, kemudian sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 1000 µl 200 mM natrium karbonat. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis. Kemudian, dilihat aktivitas yang ditunjukkan pada puncak yang dihasilkan. Penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan untuk mengetahui serapan optimal yang dapat digunakan untuk mengukur aktivitas enzim.



#### 4.2.2 Optimasi Substrat

Optimasi substrat dilakukan untuk menentukan konsentrasi optimal substrat yang digunakan dengan menggunakan aktivitas enzim 0,15 U/mg. Konsentrasi substrat yang diuji adalah 1; 2; 2,5; 5; 10; 15; 20; dan 30 mM. Konsentrasi yang diuji hampir sama dengan penelitian sebelumnya, hanya dilakukan beberapa variasi konsentrasi. Hal ini untuk menghasilkan grafik konsentrasi substrat yang sempurna. Menurut Kikkoman, substrat yang digunakan adalah 5 mM dan setelah dilakukan pengujian konsentrasi substrat yang optimal adalah 5 mM. Data optimasi substrat dapat dilihat pada Tabel 4.7.



**Gambar 4.1** Kurva Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Konsentrasi Substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) 1; 2; 2,5; 5; 10; 15; 20; dan 30 mM.

#### 4.2.3 Optimasi pH dapar fosfat

Optimasi pH dapar fosfat dilakukan dengan variasi pH yaitu pH 6,6; 6,8; dan 7,0. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada pH 6,8 enzim bekerja optimal. Hasil optimasi aktivitas enzim dengan variasi pH dapar fosfat dapat dilihat pada Tabel 4.9.

#### 4.2.4 Optimasi Suhu Inkubasi

Optimasi suhu inkubasi dilakukan dengan variasi suhu 30 (Lee, 2001) , 37 (Si, 2010), dan 40°C. Proses inkubasi dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama diinkubasi dengan suhu 30, 37, dan 40°C selama 5 menit. Hal ini bertujuan agar panas dapat masuk ke dalam tabung reaksi yang berisi DMSO, dapar fosfat, dan substrat 5 mM. Tahap kedua diinkubasi dengan suhu 30, 37, dan 40°C selama 15 menit. Hasil menunjukkan bahwa pada suhu inkubasi 37°C enzim bekerja optimal. Hasil optimasi aktivitas enzim dengan variasi suhu dapat dilihat pada Tabel 4.10.

#### 4.3 Uji Aktivitas Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase

Uji aktivitas penghambatan enzim ini dilakukan pada hasil fraksi cair-cair yaitu ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol. Masing-masing ekstrak ditimbang sebesar  $\pm 100$  mg dan ditambahkan DMSO secukupnya. DMSO berguna untuk membantu kelarutan ekstrak. Selanjutnya dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml dan dicukupkan volumenya dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga diperoleh konsentrasi 1%. Kemudian, dilakukan pengenceran hingga diperoleh konsentrasi 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; dan 0,03125%.

Uji aktivitas penghambatan ini menggunakan larutan enzim dengan konsentrasi 0,15 U/mL dan konsentrasi larutan substrat 5mM. Pengamatan aktivitas dari ekstrak dilakukan dengan cara membandingkan antara sampel (ekstrak) dan blanko. Dimana, larutan blanko merupakan larutan yang hanya menggunakan DMSO tidak menggunakan sampel (ekstrak) dengan perlakuan yang sama dengan sampel. Masing- masing blanko dan sampel dikoreksi dengan kontrol. Perlakuan untuk kontrol hampir sama dengan sampel dan blanko hanya saja setelah inkubasi tahap pertama ditambahkan natrium karbonat terlebih dahulu, dan pada inkubasi tahap kedua ditambahkan enzim. Kemudian, dilakukan pengukuran produk reaksi antara alfa-glukosidase dan p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida yang diukur serapan pada panjang gelombang maksimum yaitu 400 nm.

Pengujian standar akarbose dilakukan terlebih dahulu. Hal ini bertujuan agar dapat membandingkan antara IC<sub>50</sub> akarbose dan IC<sub>50</sub> sampel (ekstrak). Akarbose dipilih sebagai pembanding karena akarbose merupakan obat

antidiabetes yang bekerja dalam menghambat alfa-glukosidase yang beredar di Indonesia dan juga akarbose sudah menjadi pembanding yang diakui secara internasional. Selain itu, dalam hal struktur, akarbose memiliki struktur yang hampir sama dengan substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida.

Pengamatan aktivitas penghambatan enzim ini dilakukan oleh semua fraksi dari partisi cair-cair dengan konsentrasi 0,03125%; 0,0625%; 0,125%, 0,25%; 0,5%; dan 1%. Semua aktivitas penghambatan alfa-glukosidase dari fraksi partisi cair-cair dibandingkan dengan standar (akarbose). Semakin rendah  $IC_{50}$ , maka semakin tinggi aktivitas penghambatan alfa-glukosidase. Hasil menunjukkan bahwa semua fraksi dari partisi cair-cair mempunyai  $IC_{50}$  yang lebih rendah dibandingkan dengan standar akarbose. Akarbose mempunyai  $IC_{50}$  sebesar 129,5 sedangkan untuk fraksi n-heksana mempunyai  $IC_{50}$  sebesar 34,38 ppm, fraksi etil asetat mempunyai  $IC_{50}$  sebesar 8,06 ppm dan fraksi metanol mempunyai  $IC_{50}$  sebesar 27,49 ppm. Hasil pengujian penghambatan aktivitas alfa-glukosidase dari fraksi n-heksana dapat dilihat pada Tabel 4.13, fraksi etil asetat pada Tabel 4.14, dan fraksi metanol pada Tabel 4.15. Akarbose mempunyai  $IC_{50}$  yang lebih besar dikarenakan akarbose kurang sensitif terhadap enzim alfa-glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae*, sedangkan yang digunakan adalah enzim alfa glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae*. Akarbose hanya sensitif terhadap alfa-glukosidase yang berasal dari mamalia (Kim, Nam, Kurihara, & Kim, 2008; Shinde, *et al.*, 2008). Oleh karena itu, selain akarbose digunakan pula kuersetin sebagai pembanding karena dapat menghambat aktivitas alfa-glukosidase dari yeast (Kumar, Narwal, Kumar, Prakash, 2011).  $IC_{50}$  untuk kuersetin adalah 3,47 ppm. Hasil pengujian penghambatan aktivitas alfa glukosidase pada akarbose dan kuersetin dapat dilihat pada Tabel 4.11 dan 4.12. Hasil uji penghambatan aktivitas alfa-glukosidase dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Setelah didapatkan fraksi yang aktif kemudian dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom. Hasil kromatografi kolom dilakukan penggabungan dengan kromatografi lapis tipis. Penggabungan tersebut menghasilkan sepuluh fraksi yang terdiri dari 6 fraksi n-heksana: etil asetat dan 4 fraksi etil asetat: metanol. Sepuluh fraksi tersebut masing-masing dibuat 6 konsentrasi untuk dilakukan pengujian. Masing-masing ekstrak ditimbang sebesar  $\pm 85$  mg, lalu

**Universitas Indonesia**

dimasukan kedalam labu 10 mL kemudian ditambahkan metanol yang berguna untuk membantu kelarutan dari fraksi n-heksana:etil asetat. Selanjutnya ditambahkan sedikit DMSO dan di ad dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga 10 mL. Masing-masing fraksi diuji aktivitas penghambatannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 400 nm. Hasil pengujian didapatkan bahwa fraksi E yaitu fraksi dengan eluen n-heksana:etil asetat = 20:80 mempunyai  $IC_{50}$  yang paling kecil yaitu 5,60 ppm. Data  $IC_{50}$  dari masing-masing fraksi hasil kolom dapat dilihat pada Tabel 4.17 hingga 4.26.

**Tabel 4.1** Hasil uji penghambatan aktivitas alfa-glukosidase dari hasil partisi cair-cair

No.	Bahan yang diuji	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	Akarbose	129,75
2	Kuersetin	3,47
3	Ekstrak n-Heksan	34,38
4	Ekstrak Etil Asetat	8,06
5	Ekstrak Metanol	27,49

#### 4.4 Kromatografi Kolom

Fraksi yang aktif dari hasil partisi cair-cair yaitu fraksi etil asetat dilanjutkan pengamatannya dengan menggunakan kromatografi kolom. Kolom yang digunakan adalah kolom kering dipercepat dan untuk sampel digunakan cara kering. Tujuan dari penggunaan kolom ini adalah mempercepat dalam memisahkan fraksi-fraksi. Ekstrak kental etil asetat yang digunakan seberat 4,0 g. Silika gel yang dimasukan kedalam kromatografi kolom adalah 66,0 g. Kemudian, silika gel dipadatkan dengan cara di vakum sambil diketuk-ketuk pada bagian sisi kolom. Hal ini bertujuan agar kolom tidak pecah dan menghasilkan pemisahan yang baik

dan ditambahkan kertas saring. Kemudian, ditambahkan pelarut n-heksana agar kolom jenuh. Ekstrak etil asetat dikeringkan dengan penambahan silika gel. Kemudian, ekstrak kering dimasukkan kedalam kolom. Selanjutnya dimasukkan kertas saring yang bertujuan agar pengotor dari pelarut tidak masuk kedalam kolom. Selanjutnya, pelarut dimasukkan kedalam kolom. Pelarut yang digunakan adalah n-heksana :etil asetat = 100:0, n-heksana :etil asetat = 95:5, n-heksana :etil asetat = 90:10, n-heksana :etil asetat = 85:15, n-heksana :etil asetat = 80:20, n-heksana :etil asetat = 75:25, n-heksana :etil asetat = 70:30, n-heksana :etil asetat = 65:35, n-heksana :etil asetat = 60:40, n-heksana :etil asetat = 50:50, n-heksana :etil asetat = 40:60, n-heksana :etil asetat = 30:70, n-heksana :etil asetat = 20:80, n-heksana :etil asetat = 10:90, etil asetat : metanol = 100:0, etil asetat : metanol = 95:5, etil asetat : metanol = 90:10, etil asetat : metanol = 85:15, etil asetat : metanol = 80:20, etil asetat : metanol = 75:25, etil asetat : metanol = 70:30, etil asetat : metanol = 65:35, etil asetat : metanol = 60:40, etil asetat : metanol = 50:50, etil asetat : metanol = 40:60, etil asetat : metanol = 30:70, etil asetat : metanol = 20:80, etil asetat : metanol = 10:90 hingga etil asetat : metanol = 0:100. Masing-masing fraksi yang dihasilkan ditampung sebanyak 200 ml, sehingga jumlah fraksi yang dihasilkan adalah 29 fraksi. Perbandingan eluen kromatografi kolom dapat dilihat pada Tabel 4.16.

#### 4.5 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis bertujuan untuk menggabungkan pola kromatogram yang sama dari fraksi hasil kromatografi kolom. Fraksi dengan profil yang sama akan digabungkan dan selanjutnya akan diuji aktivitasnya. Pada kromatografi lapis tipis ini digunakan lempeng dengan silika gel GF254 dan panjang lempeng 7,5 cm dan jarak masing-masing totolan 0,5 cm. Panjang lempeng 7,5 cm bertujuan agar ekstrak dapat terelusi dengan sempurna. Jarak totolan pun dibuat 0,5 cm untuk mencegah totolan bertabrakan akibat besar totolan tidak sama.

Dalam kromatografi lapis tipis dilakukan pencarian eluen yang sesuai agar dapat memisahkan ekstrak dengan baik. Eluen yang digunakan yaitu n-heksana:etil asetat = 4:1, n-heksana:etil asetat = 3:2, dan butanol : etil asetat: air =

4:1:5. Pencarian eluen ini bertujuan untuk menghasilkan pemisahan dan Rf yang baik. Selain untuk menggabungkan fraksi kolom, KLT juga digunakan dalam identifikasi golongan senyawa aktif untuk fraksi etil asetat dan fraksi E.

#### **4.6 Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase Dari Fraksi Teraktif**

Uji kinetika penghambatan bertujuan untuk mengetahui jenis penghambatan yang dihasilkan oleh enzim dengan adanya inhibitor dan tanpa inhibitor. Pengujian kinetika enzim dapat menggunakan plot Lineweaver-Burk, dimana sumbu x yang menunjukkan satu per konsentrasi substrat ( $1/S$ ) dan sumbu y menunjukkan satu per kecepatan reaksi enzim ( $1/V$ ). Pengujian kinetika penghambatan enzim dilakukan dengan meningkatkan konsentrasi p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida, dimana konsentrasi yang digunakan adalah 10 mM, 5 Mm, 0,25 mM, dan 0,125 mM. Pada pengujian kinetika ini digunakan ekstrak etil asetat karena memiliki  $IC_{50}$  yang kecil yaitu 8,06 ppm. Konsentrasi ekstrak etil asetat yang digunakan adalah 10,07 ppm. Data hasil kinetika dapat dilihat pada Tabel 4.2.

**Tabel 4.2** Data kinetika *Lineweaver-Burk Plot*

Konsentrasi Substrat		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)		1/S	1/V1	1/V2
		V1	V2	V1	V2			
0,1	Uji (U)	0,5856	0,4820	0,5521	0,4484	0,1	1,8113	2,2302
	Kontrol (K)	0,0335	0,0336					
0,2	Uji (U)	0,5983	0,4430	0,5725	0,4169	0,2	1,7467	2,3981
	Kontrol (K)	0,0258	0,0261					
0,4	Uji (U)	0,5482	0,3008	0,5144	0,2700	0,4	1,9440	3,7037
	Kontrol (K)	0,0338	0,0308					
0,8	Uji (U)	0,5118	0,2325	0,4791	0,2036	0,8	2,0869	4,9123
	Kontrol (K)	0,0327	0,0289					

Keterangan

V1= tanpa inhibitor (DMSO)

V2=dengan inhibitor (konsentrasi sampel 10,07 ppm)

**Tabel 4.3** Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten

Sampel	V1	V2
a	1,7254	1,8145
b	0,4583	3,9908
r	0,9409	0,9849
Vmaks	0,5796	0,5511
Km	0,6318	2,1993

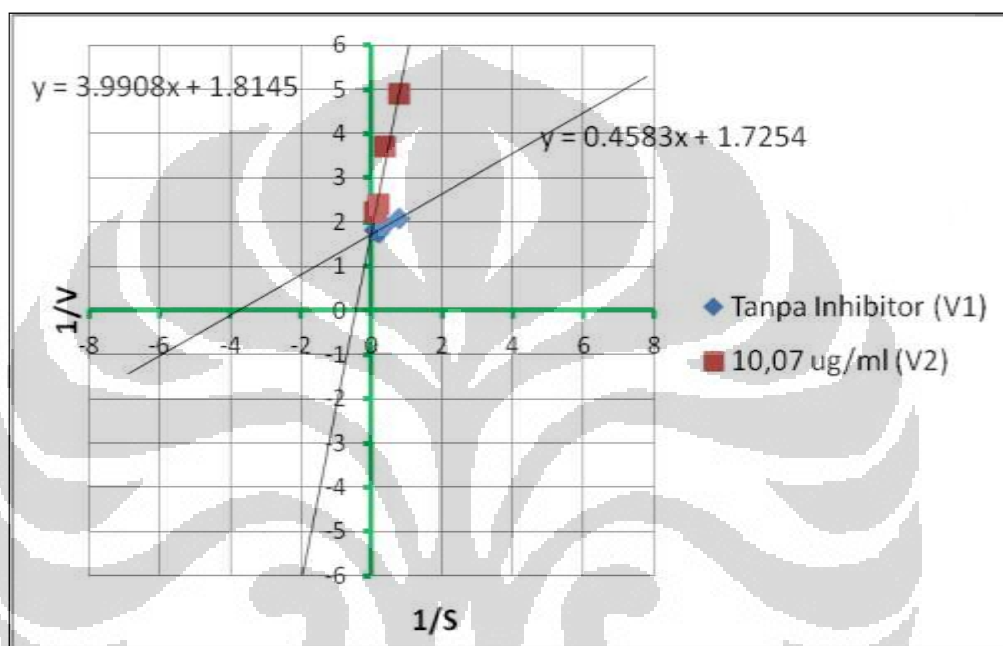
Keterangan

V1= tanpa inhibitor (DMSO)

V2=dengan inhibitor (konsentrasi sampel 10,07 ppm)

Berdasarkan hasil plot yang terbentuk, fraksi etil asetat kulit batang kayu tua memiliki mekanisme penghambatan kompetitif. Pada plot dapat dilihat bahwa terjadi perpotongan di sumbu y antara garis linear dengan inhibitor dengan garis linear tanpa inhibitor. Selain itu, nilai Vmax yang dihasilkan hampir sama

antara dengan inhibitor dan tanpa inhibitor dan terjadi peningkatan nilai  $K_m$  dengan adanya inhibitor. Mekanisme penghambatan kompetitif terjadi karena inhibitor memiliki struktur yang hampir sama dengan substrat atau dapat juga disebut analog substrat (Murray, Granner, & Rodwell, 2009). Plot Lineweaver-Burk fraksi etil asetat kulit batang kayu tuah 0,25% (10,07 ppm) dapat dilihat pada Gambar 4.2.



**Gambar 4.2** Plot Lineweaver-Burk Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Kayu Tuah 0,25% (10,07 ppm) dengan Konsentrasi p-nitrofenil  $\alpha$ -D-Glukopiranosida 10; 5; 2,5; dan 1,25 mM.

#### 4.7 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia

Ekstrak etanol 80%, fraksi etil asetat, dan fraksi kolom teraktif (fraksi E) dilakukan identifikasi golongan senyawa kimia yang terkandung didalamnya. Tujuan dari dilakukan kembali identifikasi untuk ekstrak etanol 80% adalah untuk membandingkan antara golongan senyawa kimia yang terkandung didalam fraksi etil asetat dan fraksi E dengan ekstrak etanol 80%. Identifikasi golongan senyawa fraksi teraktif dari partisi cair-cair dan fraksi hasil kolom bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang aktif dalam menghambat aktivitas alfa-glukosidase. Identifikasi pada fraksi etil asetat dan fraksi hasil kolom teraktif dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) karena jumlah



fraksi yang dihasilkan sangat sedikit. Eluen yang digunakan untuk fraksi etil asetat dan fraksi E adalah kloroform: metanol = 85:15. Eluen ini digunakan karena dapat memberikan pemisahan yang baik pada fraksi etil asetat dan fraksi hasil kolom teraktif (fraksi E). Hasil identifikasi etanol 80%, fraksi etil asetat, dan fraksi E dapat dilihat pada Tabel 4.27 dan Tabel 4.28.

#### 4.7.1 Identifikasi alkaloid

Untuk melakukan identifikasi alkaloid dilakukan pengasaman terlebih dahulu untuk menetralkan basa dari alkaloid (Robinson, 1995). Oleh karena itu, 10 mg ekstrak kental ditambahkan 1 ml HCl 2N terlebih dahulu dan 9 ml air, kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 2 menit, didinginkan. Kemudian disaring dan ditampung filtrat. Filtrat ini yang digunakan sebagai larutan percobaan selanjutnya. Standar yang digunakan adalah *Chinae cortex*.

Pengujian pertama dengan pereaksi Bouchardat. Reaksi ini positif jika terbentuk endapan coklat sampai dengan hitam. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol 80% negatif alkaloid. Pengujian kedua dengan menggunakan pereaksi Mayer. Pereaksi Mayer paling banyak digunakan untuk mendeteksi alkaloid karena pereaksi ini memberikan endapan dengan hampir semua jenis alkaloid. Reaksi positif jika terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak 80% negatif alkaloid. Pengujian ketiga dengan pereaksi Dragendorff, terbentuk endapan jingga coklat (positif alkaloid). Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol 80% negatif (tidak memberikan endapan dengan ketiga pereaksi tersebut).

Identifikasi alkaloid untuk fraksi etil asetat dan fraksi hasil kolom teraktif dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Penggunaan KLT dikarenakan jumlah ekstrak yang sedikit dan tidak bercampurnya fraksi etil asetat dengan air. Kemudian, hasil partisi etil asetat dan fraksi E disemprot dengan pereaksi Dragendorff. Penampang bercak fraksi etil asetat dan fraksi hasil kolom dibandingkan dengan standar yaitu *Chinae cortex*. Pada *Chinae cortex* menghasilkan warna merah-orange, sedangkan untuk fraksi etil asetat dan fraksi E tidak terbentuk warna merah-orange. Hasil menunjukkan bahwa hasil partisi etil asetat dan fraksi E negatif.

#### 4.7.2 Identifikasi flavonoid

Ekstrak etanol 80% ditambah dengan 4 ml etanol 95% hingga ekstrak larut. Larutan ini digunakan sebagai larutan percobaan selanjutnya. Standar yang digunakan adalah daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*).

Larutan ekstrak 80% ditambahkan dengan 0,5 gram serbuk seng dan 2 ml HCl 2N, didiamkan 1 menit. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat P. Kocok perlahan, kemudian didiamkan 2-5 menit. Terbentuk warna merah intensif (positif flavonoid). Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol 80% negatif flavonoid karena tidak terbentuk warna merah. Pada pengujian yang kedua, ekstrak etanol 80% ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat P dan dikocok perlahan. Hasil yang positif akan terbentuk warna merah jingga hingga merah ungu (positif flavonoid) atau kuning jingga (flavon, kalkon, auron). Pada percobaan ini, ekstrak etanol 80% menunjukkan hasil yang negatif (tidak terbentuk warna kuning dibawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 365 nm).

Pengujian hasil partisi etil asetat dan E dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Identifikasi dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan dengan menotolkan ekstrak yang telah dilarutkan dalam pelarutnya pada lempeng KLT. Kemudian, dielusi dengan eluen butanol: etil asetat: air = 4:1:5 untuk standar dan disemprot dengan  $AlCl_3$ . Pembanding yang digunakan adalah *Orthosiphonis folium*. Pada standar dihasilkan warna kuning pada pemisahannya dibawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 365 nm, sedangkan pada hasil partisi etil asetat dan fraksi E tidak dihasilkan warna kuning. Hal ini menunjukkan bahwa hasil partisi etil asetat dan fraksi E negatif flavonoid.

#### 4.7.3. Identifikasi terpen

Identifikasi sterol dilakukan dengan penambahan reaksi Liberman-Bouchard. Hasil positif bila terbentuk warna merah-hijau-violet-biru (Farnsworth, 1966). Hasil identifikasi menunjukkan bahwa tidak terdapat terpen dalam ekstrak etanol 80%. Standar yang digunakan adalah bunga cengkeh (*Caryophili flos*). Kemudian dilakukan kembali kromatografi lapis tipis untuk etanol 80%. Hasil yang yang diperoleh adalah positif untuk terpen karena memberikan warna ungu

setelah dipanaskan. Walaupun memiliki warna ungu dengan intensitas yang rendah.

Fraksi etil asetat dan fraksi E dielusi dengan kloroform:metanol = 85:15, sedangkan untuk pembanding dielusi dengan benzene:etil asetat = 90:10. Pembanding yang digunakan adalah *Caryophili flos*, kemudian disemprot dengan pereaksi anisaldehyd dan dipanaskan. Hasil positif jika menghasilkan warna ungu. Hasil menunjukkan bahwa fraksi etil asetat, dan fraksi E positif untuk terpen.

#### 4.7.4. Identifikasi gula

Identifikasi gula (glikon) pada glikosida dilakukan dengan penambahan asam pekat yang berfungsi untuk memecah ikatan antara glikon dan aglikon. 10 mg ekstrak ditambahkan dengan 5 tetes pereaksi Molish dan 2 ml asam sulfat pekat. Standar yang digunakan adalah *Nerii folium*. Hasil positif jika dihasilkan cincin ungu. Ekstrak etanol 80%, Fraksi etil asetat dan fraksi E menunjukkan hasil positif gula.

#### 4.7.5. Identifikasi saponin (Departemen Kesehatan Republik Indonesia., 1995b)

Identifikasi saponin dilakukan dengan menggunakan pengocokan dengan air panas. Sehingga menghasilkan busa yang dapat bertahan lama dan masih bertahan ketika ditambahkan dengan HCl 2 N. Identifikasi ini dibandingkan dengan standar yaitu *Liquiritae radix*. Ekstrak etanol 80% memberikan hasil positif karena memberikan busa yang banyak dan dapat bertahan dalam jangka waktu yang lama. Ketika ditambah dengan HCl 2 N busa masih bertahan.

Identifikasi fraksi etil asetat dan fraksi E menggunakan KLT. Standar (*Liquiritae radix*) ditotolkan pada lempeng KLT dan dielusi dengan butanol: asam asetat:air=50:10:40. Untuk fraksi etil asetat dan fraksi E dielusi dengan kloroform:metanol = 85:15. Kemudian, disemprot dengan anisaldehyd dan dipanaskan. Standar menghasilkan warna ungu yang intensitasnya lemah, sedangkan untuk fraksi etil asetat dan fraksi E menghasilkan warna ungu. Kesimpulan fraksi etil asetat dan fraksi E positif saponin.

#### 4.7.6. Deteksi polifenol

Deteksi polifenol untuk fraksi etil asetat dan fraksi E dilakukan dengan pereaksi semprot  $\text{FeCl}_3$ . Pada umumnya pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1% digunakan untuk mengidentifikasi fenol (Robinson, 1995). Hasil KLT menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dan fraksi E positif karena menghasilkan warna hitam yang sama dengan standar. Standar yang digunakan adalah teh (*Camellia sinensis*).

#### 4.7.7 Identifikasi tanin

Pengujian tanin dilakukan dengan gelatin (positif bila membentuk endapan putih). Standar yang digunakan adalah teh (*Camellia sinensis*). Ekstrak etanol 80% memberikan endapan yang berwarna putih. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol 80% mengandung tanin. Pada fraksi etil asetat dan fraksi E tidak dilakukan identifikasi tanin karena jumlahnya sangat sedikit.

#### 4.7.8. Deteksi kuinon dan antrakuinon

Untuk deteksi hasil partisi etil asetat dan fraksi E dilakukan dengan cara KLT. Standar (*Rei radix*), fraksi etil asetat, dan fraksi hasil kolom teraktif ditotolkan pada lempeng dan dielusi dengan etilasetat:metanol:air=100:17:13. Pereaksi semprot yang digunakan adalah KOH. Standar akan menghasilkan warna ungu-merah (positif). Pada ekstrak etanol 80%, hasil partisi etil asetat dan fraksi E menunjukkan hasil yang negatif.

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil pengujian, dapat disimpulkan bahwa:

- a. Nilai  $IC_{50}$  yang dihasilkan dari hasil partisi cair-cair n-heksana, etil asetat, dan metanol berturut-turut adalah 34,38; 8,06; dan 27,49 ppm. Berdasarkan hasil  $IC_{50}$ , fraksi etil asetat memiliki aktivitas penghambatan enzim alfa glukosidase yang lebih besar.
- b. Hasil fraksi kolom dari fraksi etil asetat menunjukkan bahwa fraksi gabungan n-heksana : etil asetat = 20:80 (fraksi E) memiliki nilai  $IC_{50}$  terendah yaitu sebesar 5,60 ppm.
- c. Pengujian kinetika menunjukkan bahwa kulit batang kayu tuah dapat menghambat secara kompetitif.
- d. Golongan senyawa dari fraksi etil asetat dan fraksi hasil kolom teraktif yaitu terpen, saponin, fenol, dan gula.

#### **5.2 Saran**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan isolasi, karakterisasi struktur hasil isolasi, dan uji *in vivo* untuk tanaman kayu tuah terutama kulit batang. Sehingga, tanaman ini dapat mengurangi prevalensi penyakit diabetes.

## DAFTAR ACUAN

- Corwin, E.J. (2001). *Buku Saku Patofisiologi.Ter. Dari Handbook of Pathophysiology oleh Brahm U. Pendit*. Jakarta: EGC, 542-548.
- Dewi, R.T., Yetty, M.I., Hanafi, M., Kardono, L.B.S., Marisa, A., Indah, D.D., & Sofna, D.S.B. (2007). Inhibitory effect of koji *Aspergillus terreus* on  $\alpha$ -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(18), 3131-3135.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia.(1979). *Farmakope Indonesia* edisi III. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 755.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia.(1995a). *Farmakope Indonesia* edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 7 dan1004.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995b). *Materia Medika Indonesia Jilid VI*.(1995). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 313-316, 333-337.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 3-11.
- Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan. (2005). *Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Diabetes Mellitus*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, 16.
- Dipiro, Joseph T., Robert L. Talbert., Gary C. Yee., Gary R. Matzke., Barbara G. Wells., & L.Michael Posey. (2005). *Pharmacotherapy a pathophysiologic approach*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc, 1333-1352.
- Dong, Hua-Qiang Li Mei, Feng Zhu, Liu Fu-Lai, & Huang Jian-Bo. (2012). Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd. against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase linked to type 2 diabetes. *Food Chemistry* , 261-266.
- Elya, Berna, Basah Katrin, Mun'im Abdul, Yuliasuti Wulan, Bangun Anastasia, & Eva Septiana Kurnia. (2012). Screening of  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activity from Some Plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012.
- Farnsworth, N.R. (1966). *Biological and Phytochemical Screening of Plants*. Journal of Pharmaceutical Science 55(3), 226-276.

- Fatmawati, Sri, Shimizu Kuniyoshi, dan Kondo Ryuichiro. (2011). Ganoderol B: A potent  $\alpha$ -glukosidase inhibitor isolated from the fruiting body *Ganoderma lucidum*. *Phytomedicine*, 1053-1055.
- Griffiths, Joan M, Alexander, and Renee R., (1993). *Basic Biochemical Methods*. New York: Wiley-Liss, Inc, 19, 41-43.
- Gritter, R.J. Bobbitt J.M., & Schwarting A.E.. (1991). *Pengantar Kromatografi terjemahan dari Introduction to Chromatography oleh Kosasih Padmawinata*. Bandung: ITB, 107-129.
- Gunawan-Puteri, Maria D.P.T, Kawabata Jun. (2010). Novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Macaranga tanarius* leaves. *Food Chemistry*, 384–389.
- Guo, Li Ping, Ting Fu Jiang, Zhi Hua Lv, Wang Yuan Hong. (2010). Screening  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from traditional Chinese drugs by capillary. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1250–1253.
- Hanefeld, Markolf, Schaper Frank. (2008). Acarbose: oral antidiabetes drug with additional cardiovascular benefits. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 6(2), 153–163.
- Harborne, J.B. (1987). *Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Mengekstraksi Tumbuhan* (Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Penerjemah). Bandung: Penerbit ITB, 21-27.
- Hoffmann, P. 2006. *Antidesma* in Malesia and Thailand: 1—292. Royal Botanic Gardens, Kew.  
<http://www.nationaalherbarium.nl/euphorbs/specA/Antidesma.htm>. Januari 23, 2012. Pukul 12.38
- Indonesian Institute of Science National Biological. (1985). *An Alphabetical List Of Plant Species Cultivated In The Hortus Botanicus Bogoriensis*. Bogor: Republic Of Indonesia, 19.
- Jones, Samuel, & Luchsinger A.E. (1987). *Plant Systematics* (2 ed.). Singapore: Mc Graw-Hill Book, 477 dan 480.
- Kikkoman Corporation. (2001).  *$\alpha$ -Glucosidase ( $\alpha$ GLS-SE)*.  
[http://www.kikkoman.co.jp/bio/j/rinsyou/index\\_enz.html#Enzymes](http://www.kikkoman.co.jp/bio/j/rinsyou/index_enz.html#Enzymes). Januari 19, 2012. Pukul 15.52.
- Kim, K.Y., Nam, K.A., Kurihara, H., & Kim, S.M. (2008). Potent  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors Purified from the Red Alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry*, 69: 2820-2825.

- Kumar, Sunil, Narwal Smita, Kumar Vipin, Prakash Om. (2011).  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy review*, 115.
- Lai, Yi-Chun, Chen Chien-Kuang, Tsai Sheng-Fa, dan Lee Shoei-Sheng. (2011). Triterpenes as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Fagus hayatae*. *Phytochemistry*, 206-211.
- Lee, Soo-Kyung, Hwang Ji-Yeon, Jo Ja-Rim, Kim Myung-Jin, Ki Mi-Eun, & Kim Jung-In. (2007). Inhibitory activity of *Euonymus alatus* against alpha-glucosidase in vitro and in vivo. *Nutrition Research and Practise* , 184-188.
- Lehninger, Albert L. (1995). Dasar-dasar biokimia jilid 1 (M. Thenawidjaja, Trans., pp. 235-276). Jakarta: Erlangga.
- Murray, Robert K, Granner, D.K., & Rodwell V.W. (2009). *Biokimia Harper edisi 27 terjemahan dari Harper's Biochemistry 27<sup>th</sup> oleh Brahm U.Pendit*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hal. 53;65; 68-74.
- Priyanto. 2009. *Farmakoterapi Dan Terminologi Medis*. Depok: Lembaga Studi Dan Konsultasi Farmakologi (Leskofi), 165-167.
- Roth, J.H, & Gottfried B. (1988). *Analisis Farmasi terjemahan dari Pharmazeutische Analytik oleh Dr. Sarjono Kisman dan Dr. Slamet Ibrahim*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press, 419-424.
- Robinson, Trevor;. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi* (6 ed.). (K. Padmawinata, Trans.) Bandung: ITB, 76.
- RxList Inc. (2011, Mei 17). *Precose® (acarbose tablets)*. Januari, 19, 2012. <http://www.rxlist.com/precose-drug.htm>.
- Samuelsson, G. (1999). *Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy (4<sup>th</sup> ed.)*. Swedia: Apotekarsocieteten, 46-47.
- Satyajit D.S, Latif Z, & Gray A.I. 2006. *Natural Products Isolation*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 117-123.
- Si, Mei-Mei, Lou Jian-shu, Shena Juan-Na, Wua Hong-Hai, & Bo Yanga. (2010). Insulin Releasing And Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity Of Ethyl Acetate Fraction Of *Acorus calamus* In Vitro and In Vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 154–159.
- Sigma-Aldrich. (1996). *Sigma Quality Control Test Procedure Enzymatic Assay of  $\alpha$ -Glucosidase*. Januari 20, 2012. <http://www.sigma-aldrich.com>.
- Sim, Lyann, Willemsma Carly, Mohan Sankar, Y Hassan. Naim, B. Pinto Mario, & R.Rose David. (2010). Structural Basis For Substrate Selectivity in



Human Maltase-Glucoamylase and Sucrase-Isomaltase N-terminal Domains. *The Journal Of Biological Chemistry*, 17763-17770.

- Simbala, Herny E.I. (2009). Analisis Senyawa Alkaloid Beberapa Jenis Tumbuhan Obat Sebagai Bahan Aktif Fitofarmaka. *Pasific Journal*, 489-494.
- Sudoyo, A., Setyiohadi, B., Alwi, I., Simadibrata, M., & Setiati, S. (2006). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam* (4 ed., Vol. III). Jakarta: Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1853.
- Sugiwati, Sri., Setiasih Siswati & Afifah Efy. (2009). *Antihyperglycemic activity of the mahkota dewa [Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.] leaf extracts as an alpha glucosidase inhibitor*. *Makara Kesehatan* 13(2), 74-78.
- Sukandar, Elin Y., Andrajati, R., Sigit, J.I., Adnyana, I.K, Setiadi, A.A.P., & Kusnandar. (2008). *Isofarmakoterapi*. Jakarta: PT. ISFI Penerbitan, 26-36.
- Tjay, T.H., dan Rahardja K. (2007). *Obat-obat Penting*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo, 693-713.
- Wafo, P. R. (2011). Kurane-type diterpenoids from *Cromoleana odorata*, their X-ray diffraction studies and potent  $\alpha$ -glukosidase inhibition of 16-kauren-19-oic acid. *Fitoterapia* , 642-646.
- Wagner, H S, Bladt, & Zgainski, E.M. (1984). *Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas* . New York: Springer-Verlag, 7-8, 53-54, 223-225, 299-304.



**Gambar 4.3** Pohon Kayu Tuah (a) dan (b)



**Gambar 4.4** Batang Kayu Tuah (*Antidesma celebicum* Miq.)



- Keterangan:
- a. Deteksi terpen dengan pereaksi semprot vanilin-asam sulfat standar (Caryophily flos)
  - b. Deteksi terpen dengan pereaksi semprot vanilin-asam sulfat ekstrak etanol 80%
  - c. Deteksi terpen dengan pereaksi semprot vanilin-asam sulfat hasil partisi etil asetat
  - d. Deteksi terpen dengan pereaksi semprot vanilin-asam sulfat ekstrak etanol 80% hasil fraksi kolom teraktif (Fraksi E)

**Gambar 4.5** Identifikasi Terpen Ekstrak Etanol 80%, Hasil Partisi Etil Asetat, dan Fraksi Hasil Kolom yang Paling Aktif (Fraksi E).

**Tabel 4.4** Persentase Penyusutan Bobot Simplisia Kulit Batang Kayu Tuah Setelah Dikeringkan

Simplisia	Sebelum dikeringkan (g)	Sesudah dikeringkan (g)	Susut Pengerangan (%)
<i>Antidesma celebicum</i>	3700	1700	54,05

**Tabel 4.5** Rendemen Ekstrak Etanol 80% Ranting Kayu Tuah

Simplisia	Berat Simplisia (g)	Berat Ekstrak (g)	Rendemen Ekstrak (%)
Kulit batang kayu tuah	901,8	192,65	21,36

**Tabel 4.6** Jumlah Berat Hasil Partisi Cair-Cair

	Berat (g)
Fraksi n-Heksana	2,66
Fraksi Etil Asetat	6,20
Fraksi Metanol	41,52

**Tabel 4.7** Optimasi Aktivitas Enzim Dengan Variasi Konsentrasi Substrat

Konsentrasi Substrat		Serapan (A)		Serapan rata-rata	U-K	Aktivitas Enzim	
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>			U/mL	U/mg
1 mM	Uji (U)	0,2343	0,2336	0,2455	0,2345	0,3075	3,075
	Kontrol (K)	0,0387	0,0409	0,0011			
2 mM	Uji (U)	0,3251	0,3073	0,3162	0,2791	0,3660	3,660
	Kontrol (K)	0,0460	0,0281	0,0371			
2,5 mM	Uji (U)	0,3960	0,3829	0,3895	0,3433	0,4502	4,502
	Kontrol (K)	0,0387	0,0537	0,0462			
5 mM	Uji (U)	0,6917	0,6943	0,6930	0,6144	0,8058	8,508
	Kontrol (K)	0,0718	0,0854	0,0786			
10 mM	Uji (U)	0,6512	0,6747	0,6630	0,5787	0,7589	7,589
	Kontrol (K)	0,0802	0,0883	0,0843			
15 mM	Uji (U)	0,6404	0,6622	0,6513	0,5547	0,7275	7,275
	Kontrol (K)	0,0985	0,0947	0,0966			
20 mM	Uji (U)	0,6456	0,6519	0,6488	0,5508	0,7224	7,224
	Kontrol (K)	0,0983	0,0977	0,0980			
30 mM	Uji (U)	0,6436	0,6515	0,6476	0,4878	0,6397	6,397
	Kontrol (K)	0,1597	0,1598	0,1598			

Berdasarkan tabel diatas, dibuat kurva optimasi aktivitas enzim terhadap variasi konsentrasi substrat berdasarkan data berikut :

**Tabel 4.8** Data Aktivitas Enzim

Konsentrasi substrat (mM)	Aktivitas enzim (U/mg)
1	3,075
2	3,660
2.5	4,502
5	8,508
10	7,589
15	7,275
20	7,224
30	6,397

**Tabel 4.9** Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi pH

Konsentrasi Substrat	Dapar Fosfat		Serapan (A)		Serapan rata-rata	U-K	Aktivitas Enzim	
			A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>			U/mL	U/mg
5 mM	pH 6,60	Uji (U)	0,3630	0,3602	0,3616	0,2727	0,3576	3,576
		Kontrol (K)	0,0895	0,0883	0,0889			
	pH 6,80	Uji (U)	0,6917	0,6943	0,6930	0,6144	0,8958	8,058
		Kontrol (K)	0,0718	0,0854	0,0786			
	pH 7,00 pengenceran 50%	Uji (U)	0,3105	0,3129	0,3117	0,2656	0,3483 (x 2)	6,966
		Kontrol (K)	0,0457	0,0466	0,0462			

**Tabel 4.10** Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Suhu Inkubasi

Konsentrasi Substrat	Suhu (°C)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	U-K	Aktivitas Enzim	
			A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>			U/mL	U/mg
5 mM	30	Uji (U)	0,2699	0,2692	0,2696	0,2334	0,3060	3,060
		Kontrol (K)	0,0364	0,0359	0,0362			
	37	Uji (U)	0,6720	0,6644	0,6682	0,6354	0,8333	8,333
		Kontrol (K)	0,0345	0,0311	0,0328			
	40	Uji (U)	0,4203	0,4276	0,4240	0,3822	0,5012	5,012
		Kontrol (K)	0,0414	0,0422	0,0418			

**Tabel 4.11** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Akarbose sebagai Pembanding

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
2,08	Uji	0,6818	0,6823	0,6821	0,6162	5,66
	Kontrol	0,0652	0,0665	0,0659		
4,17	Uji	0,6785	0,6720	0,6753	0,6130	6,15
	Kontrol	0,0631	0,0614	0,0623		
8,33	Uji	0,6527	0,6505	0,6516	0,5938	9,1
	Kontrol	0,0566	0,0590	0,0578		
16,67	Uji	0,6321	0,6307	0,6314	0,5794	11,30
	Kontrol	0,0508	0,0531	0,0520		
33,33	Uji	0,6073	0,6016	0,6045	0,5557	14,93
	Kontrol	0,0496	0,0480	0,0488		
66,67	Uji	0,5125	0,5044	0,5085	0,4652	28,78
	Kontrol	0,0463	0,0402	0,0433		
	Blanko	0,7170	0,7137	0,7154	0,6532	
	Kontrol	0,0625	0,0618	0,0622		
Persamaan regresi linier: $y = 5,0799 + 0,3462x$					a	5,0799
					b	0,3462
					r	0,9934
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	129,75



**Tabel 4.12** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Kuersetin sebagai Pembanding

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
0,42	Uji	0,6458	0,6454	0,6456	0,5800	7,72
	Kontrol	0,0659	0,0652	0,0656		
0,83	Uji	0,6040	0,6082	0,6061	0,5450	13,29
	Kontrol	0,0603	0,0619	0,0611		
1,67	Uji	0,5695	0,5751	0,5723	0,5144	22,18
	Kontrol	0,0592	0,0566	0,0579		
2,22	Uji	0,4921	0,4907	0,4914	0,4416	29,74
	Kontrol	0,0502	0,0493	0,0498		
2,5	Uji	0,4514	0,4529	0,4522	0,4012	36,17
	Kontrol	0,0502	0,0518	0,0510		
3,33	Uji	0,3667	0,3605	0,3636	0,3128	50,24
	Kontrol	0,0511	0,0506	0,05085		
	Blanko	0,6963	0,6926	0,6945	0,6532	
	Kontrol	0,0665	0,0654	0,0660		
Persamaan regresi linier: $y = 0,4523 + 14,2777x$					a	0,4523
					b	14,2777
					r	0,9926
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	3,4703

**Tabel 4.13** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase Partisi n-Heksana

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
1,06	Uji	0,6448	0,6512	0,6480	0,5849	17,23
	Kontrol	0,0630	0,0632	0,0631		
2,12	Uji	0,6367	0,6407	0,6387	0,5762	18,47
	Kontrol	0,0623	0,0627	0,0625		
4,24	Uji	0,6203	0,6235	0,6219	0,5600	20,75
	Kontrol	0,0618	0,0620	0,0619		
8,48	Uji	0,5817	0,5846	0,58315	0,5228	26,02
	Kontrol	0,0602	0,0606	0,0604		
16,97	Uji	0,5414	0,5215	0,5315	0,4849	31,38
	Kontrol	0,0473	0,0458	0,0466		
33,93	Uji	0,3964	0,3959	0,3962	0,3530	50,04
	Kontrol	0,0444	0,0419	0,0432		
	Blanko	0,7373	0,7350	0,7362	0,7067	
	Kontrol	0,0316	0,0274	0,0295		
Persamaan regresi linier: $y = 16,45248 + 0,975675x$					a	16,45248
					b	0,975675
					r	0,996945
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	34,38

**Tabel 4.14** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase Partisi Etil Asetat

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
0,63	Uji	0,4188	0,4199	0,4194	0,3749	45,74
	Kontrol	0,0441	0,0449	0,0445		
1,26	Uji	0,4093	0,4186	0,4140	0,3660	47,03
	Kontrol	0,0453	0,0507	0,0480		
2,52	Uji	0,3910	0,3978	0,3944	0,3556	48,53
	Kontrol	0,0391	0,0385	0,0388		
5,03	Uji	0,3851	0,3871	0,3861	0,3492	49,47
	Kontrol	0,0425	0,0313	0,0369		
10,07	Uji	0,3793	0,3725	0,3759	0,3386	50,99
	Kontrol	0,0400	0,0346	0,0373		
20,14	Uji	0,3419	0,3470	0,3445	0,3133	54,65
	Kontrol	0,0309	0,0315	0,0312		
	Blanko	0,7083	0,7006	0,7045	0,6910	
	Kontrol	0,0130	0,0139	0,0135		
Persamaan regresi linier: $y = 46,685 + 0,4111x$					a	46,685
					b	0,4111
					r	0,9718
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	8,06

**Tabel 4.15** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase Partisi Metanol

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
1,41	Uji	0,6536	0,6266	0,6401	0,6047	14,23
	Kontrol	0,0326	0,0382	0,0354		
2,82	Uji	0,5946	0,6068	0,6007	0,5484	22,21
	Kontrol	0,0489	0,0557	0,0523		
5,65	Uji	0,5137	0,5161	0,5149	0,4831	31,48
	Kontrol	0,0315	0,0321	0,0318		
11,29	Uji	0,4923	0,4937	0,4930	0,4568	35,20
	Kontrol	0,0346	0,0378	0,0362		
22,58	Uji	0,4233	0,4203	0,4218	0,3908	44,57
	Kontrol	0,0291	0,0329	0,0310		
45,16	Uji	0,3978	0,3910	0,3944	0,3360	52,34
	Kontrol	0,0498	0,0670	0,0584		
	Blanko	0,7235	0,7329	0,7282	0,7050	
	Kontrol	0,0238	0,0226	0,0232		
Persamaan regresi linier: $y = 22,078 + 1,0157x$					a	22,078
					b	1,0157
					r	0,906532
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	27,49

**Tabel 4.16** Perbandingan Eluen Hasil Kromatografi Kolom dan Hasil Gabungan Fraksi

Eluen	Perbandingan Eluen	Keterangan
Heksan-Etil asetat	100:0	Fraksi Gabungan A
	95:5	
	90:10	
	85:15	
	80:20	Fraksi Gabungan B
	75:25	Fraksi Gabungan C
	70:30	
	65:35	
	60:40	Fraksi Gabungan D
	50:50	
	40:60	
	30:70	Fraksi Gabungan E
	20:80	
	10:90	Fraksi Gabungan F
0:100	Fraksi Gabungan G	
Etil Asetat : Metanol	95:5	Fraksi Gabungan H
	90:10	
	85:15	
	80:20	
	75:25	Fraksi Gabungan I
	70:30	
	65:25	
	60:40	Fraksi Gabungan J
	50:50	
	40:60	
	30:70	
20:80		
10:90		

**Tabel 4.17** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi A

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
0,85	Uji	0,6829	0,6832	0,6831	0,6532	8,79
	Kontrol	0,0277	0,0321	0,0299		
1,7	Uji	0,6655	0,6663	0,6659	0,6369	11,07
	Kontrol	0,0249	0,0331	0,029		
3,4	Uji	0,6536	0,6542	0,6539	0,6238	12,90
	Kontrol	0,0285	0,0317	0,0301		
6,8	Uji	0,6040	0,6149	0,6095	0,5557	22,4
	Kontrol	0,0469	0,0607	0,0538		
13,6	Uji	0,4430	0,4419	0,4424	0,4196	41,4
	Kontrol	0,0207	0,0251	0,0229		
27,2	Uji	0,3928	0,3933	0,3931	0,3580	50,01
	Kontrol	0,0315	0,0387	0,0351		
	Blanko	0,7448	0,7458	0,7453	0,7162	
	Kontrol	0,0281	0,0301	0,0291		
Persamaan regresi linier: $y = 8,3318 + 1,8621x$					a	8,3318
					b	1,8621
					r	0,9585
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	24,44

**Tabel 4.18** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi B

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
0,89	Uji	0,6581	0,6499	0,6540	0,6238	10,23
	Kontrol	0,0279	0,0325	0,0302		
1,77	Uji	0,6261	0,6173	0,6217	0,5902	15,06
	Kontrol	0,0306	0,0324	0,0315		
3,53	Uji	0,5873	0,5853	0,5863	0,5566	19,90
	Kontrol	0,0262	0,0332	0,0297		
7,06	Uji	0,5414	0,5425	0,5419	0,5133	26,13
	Kontrol	0,0251	0,0321	0,0286		
14,12	Uji	0,4425	0,4500	0,4463	0,4165	40,06
	Kontrol	0,0295	0,0301	0,0298		
28,24	Uji	0,3783	0,3787	0,3785	0,3115	55,17
	Kontrol	0,0495	0,0845	0,0670		
	Blanko	0,7239	0,7251	0,7245	0,6949	
	Kontrol	0,0251	0,0341	0,0296		
Persamaan regresi linier: $y = 13,598 + 1,4960x$					a	13,598
					b	1,4960
					r	0,9817
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	24,33

**Tabel 4.19** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi C

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
1,73	Uji	0,6334	0,6332	0,6333	0,6123	11,94
	Kontrol	0,0222	0,0198	0,0210		
3,47	Uji	0,6295	0,6304	0,6299	0,6026	13,33
	Kontrol	0,0257	0,0289	0,0273		
4,16	Uji	0,5400	0,5414	0,5407	0,5196	25,26
	Kontrol	0,0213	0,0209	0,0211		
6,93	Uji	0,5050	0,5061	0,5055	0,4678	32,72
	Kontrol	0,0346	0,0410	0,0378		
13,87	Uji	0,4136	0,4690	0,4413	0,4102	41,01
	Kontrol	0,0295	0,0327	0,0311		
27,73	Uji	0,3801	0,3524	0,36625	0,3476	50,01
	Kontrol	0,0153	0,022	0,0187		
	Blanko	0,7246	0,7233	0,7239	0,6953	
	Kontrol	0,0249	0,0323	0,0286		
Persamaan regresi linier: $y = 15,607 + 1,3928x$					a	15,607
					b	1,3928
					r	0,9027
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	24.69



**Tabel 4.20** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi D

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
0,93	Uji	0,7006	0,6959	0,6983	0,6505	5,9
	Kontrol	0,0426	0,053	0,0478		
1,86	Uji	0,6658	0,6694	0,6676	0,6407	7,2
	Kontrol	0,0289	0,0249	0,0269		
3,71	Uji	0,5159	0,6838	0,5999	0,5716	17,32
	Kontrol	0,0238	0,0328	0,0283		
7,42	Uji	0,5938	0,5109	0,5524	0,5263	23,87
	Kontrol	0,0235	0,0287	0,0261		
14,84	Uji	0,4503	0,4536	0,4519	0,4176	39,59
	Kontrol	0,0337	0,0349	0,0343		
29,68	Uji	0,3037	0,4430	0,3734	0,3452	50,06
	Kontrol	0,0249	0,0315	0,0282		
	Blanko	0,7377	0,7105	0,7241	0,6913	
	Kontrol	0,0327	0,0329	0,0328		
Persamaan regresi linier: $y = 8,9941 + 1,5396x$					a	8,9941
					b	1,5396
					r	0,95378
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	26,63

**Tabel 4.21** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi E

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
0,24	Uji	0,6173	0,6149	0,6161	0,5878	18,78
	Kontrol	0,281	0,0285	0,0283		
0,48	Uji	0,5468	0,5471	0,5469	0,5239	27,61
	Kontrol	0,0249	0,0211	0,0230		
0,96	Uji	0,5414	0,05302	0,5358	0,4984	31,14
	Kontrol	0,0424	0,0324	0,0374		
1,92	Uji	0,4902	0,4675	0,4788	0,4501	37,81
	Kontrol	0,0268	0,0306	0,0287		
3,83	Uji	0,4149	0,4449	0,4299	0,4003	44,7
	Kontrol	0,0279	0,0313	0,0296		
7,66	Uji	0,3199	0,3623	0,3411	0,3129	56,76
	Kontrol	0,0265	0,0299	0,0282		
	Blanko	0,7458	0,7433	0,7446	0,7238	
	Kontrol	0,0240	0,0176	0,0208		
Persamaan regresi linier: $y = 24,836 + 4,492x$					a	24,836
					b	4,492
					r	0,95021
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	5,60

**Tabel 4.22** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi F

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
1,04	Uji	0,6694	0,6670	0,6682	0,6474	10,17
	Kontrol	0,0213	0,0203	0,0208		
2,08	Uji	0,6353	0,6326	0,6339	0,6126	12,93
	Kontrol	0,0216	0,0212	0,0214		
4,17	Uji	0,5438	0,5444	0,5441	0,5221	25,25
	Kontrol	0,0216	0,0224	0,0220		
8,34	Uji	0,5216	0,5135	0,5175	0,4928	29,95
	Kontrol	0,0234	0,0260	0,0247		
16,68	Uji	0,4412	0,4406	0,4409	0,4147	41,06
	Kontrol	0,0254	0,0270	0,0262		
33,37	Uji	0,3591	0,3483	0,3537	0,3212	54,34
	Kontrol	0,0296	0,0354	0,0325		
	Blanko	0,7249	0,7233	0,7241	0,7036	
	Kontrol	0,0199	0,0211	0,0205		
Persamaan regresi linier: $y = 14,796 + 1,293x$					a	14,796
					b	1,293
					r	0,9750
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	27,23

**Tabel 4.23** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi G

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
0,76	Uji	0,6691	0,6658	0,5611	0,5365	26,7
	Kontrol	0,0224	0,0268	0,0246		
1,53	Uji	0,5071	0,5045	0,5058	0,4817	31,49
	Kontrol	0,0228	0,0254	0,0241		
3,05	Uji	0,5066	0,5017	0,5042	0,4800	31,74
	Kontrol	0,0235	0,0249	0,0242		
6,10	Uji	0,4456	0,4430	0,4443	0,4204	40,21
	Kontrol	0,0226	0,0252	0,0239		
12,22	Uji	0,3899	0,3910	0,3905	0,3670	47,81
	Kontrol	0,0232	0,0232	0,0235		
24,45	Uji	0,3552	0,3516	0,3534	0,3294	53,16
	Kontrol	0,0251	0,0229	0,0240		
	Blanko	0,7246	0,7239	0,7243	0,7032	
	Kontrol	0,0294	0,0396	0,0345		
Persamaan regresi linier: $y = 29,902 + 1,0746x$					a	29,902
					b	1,0746
					r	0,9385
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	18,70

**Tabel 4.24** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi H

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
1,04	Uji	0,6993	0,6936	0,6965	0,6603	8,86
	Kontrol	0,0311	0,0393	0,0352		
2,09	Uji	0,6843	0,6759	0,6801	0,6491	10.4
	Kontrol	0,0244	0,0376	0,0310		
4,18	Uji	0,5767	0,6073	0,5920	0,5698	21.35
	Kontrol	0,0210	0,0234	0,0222		
8,37	Uji	0,5774	0,5414	0,5594	0,5353	26.12
	Kontrol	0,0236	0,0246	0,0241		
16,74	Uji	0,4680	0,4734	0,4628	0,4507	37.79
	Kontrol	0,0250	0,0190	0,0200		
33,48	Uji	0,3876	0,3735	0,3806	0,3621	50.01
	Kontrol	0,0168	0,0202	0,0185		
	Blanko	0,7047	0,7039	0,7043	0,7245	
	Kontrol	0,0179	0,0225	0,0202		
Persamaan regresi linier: $y = 12,231 + 1,2313x$					a	12,231
					b	1,2313
					r	0,9575
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	30,67

**Tabel 4.25** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi I

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
1,77	Uji	0,6717	0,6737	0,6727	0,6396	7,2
	Kontrol	0,0328	0,0334	0,0331		
3,54	Uji	0,6180	0,6404	0,6292	0,6014	12,8
	Kontrol	0,0269	0,0287	0,0278		
7,07	Uji	0,5605	0,5302	0,5454	0,5209	24,47
	Kontrol	0,0231	0,0259	0,0245		
14,15	Uji	0,5051	0,5215	0,5133	0,4957	28,12
	Kontrol	0,0171	0,0181	0,0176		
28,3	Uji	0,4409	0,4233	0,4321	0,4146	39,89
	Kontrol	0,0168	0,0182	0,0175		
56,6	Uji	0,3467	0,3073	0,3270	0,3134	54,56
	Kontrol	0,0125	0,0147	0,0136		
	Blanko	0,7114	0,7109	0,7111	0,6897	
	Kontrol	0,0209	0,0219	0,0214		
Persamaan regresi linier: $y = 13,126 + 0,7923 x$					a	13,126
					b	0,7923
					r	0,9545
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	46,54

**Tabel 4.26** Hasil Pengujian Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase pada Fraksi J

Konsentrasi Substrat (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata (A)	S-K	% Penghambatan
		A1	A2			
0,89	Uji	0,5720	0,6477	0,6099	0,5818	15,03
	Kontrol	0,0270	0,0292	0,0281		
1,78	Uji	0,5865	0,5637	0,5751	0,5473	20,08
	Kontrol	0,0264	0,0292	0,0278		
3,56	Uji	0,5205	0,5137	0,5171	0,4945	27,78
	Kontrol	0,0219	0,0233	0,0226		
7,11	Uji	0,5154	0,5061	0,5108	0,4749	30,65
	Kontrol	0,0342	0,0376	0,0359		
14,22	Uji	0,4459	0,4425	0,4442	0,4116	39,89
	Kontrol	0,0311	0,0341	0,0326		
28,43	Uji	0,3792	0,3792	0,3656	0,3385	50,56
	Kontrol	0,0263	0,0279	0,0271		
	Blanko	0,7061	0,7140	0,7101	0,6848	
	Kontrol	0,0246	0,0260	0,0253		
Persamaan regresi linier: $y = 19,678 + 1,1774x$					a	19,678
					b	1,1774
					r	0,9539
					IC <sub>50</sub> (µg/mL)	25,75

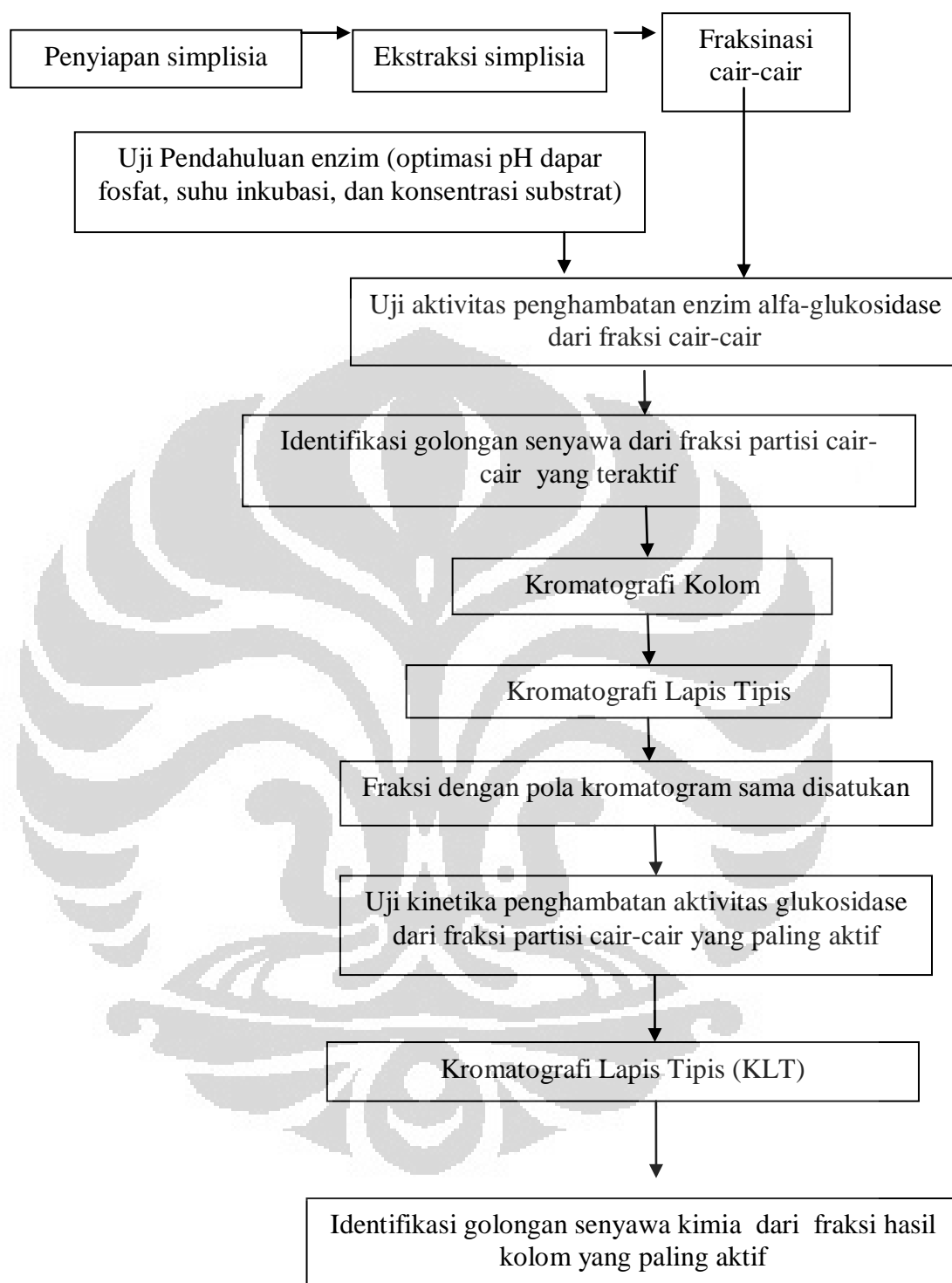
**Tabel 4.27** Hasil Identifikasi Golongan Senyawa Pada Fraksi Etanol 80% , Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi Teraktif Hasil Kolom KayuTuah Menggunakan Metode Kualitatif

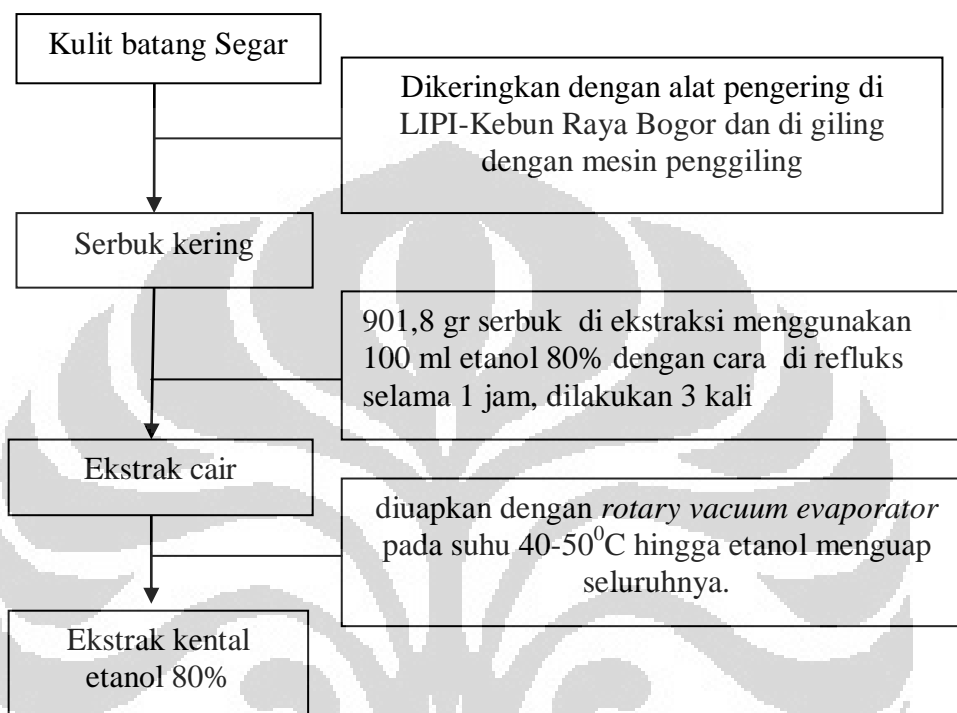
Golongan Senyawa		Kayu Tuah ( <i>Antidesma celebicum</i> Miq.)		
		Etanol 80%	Fraksi Etil asetat	Fraksi Hasil Kolom Teraktif (Fraksi E)
Alkaloid	Mayer LP	-	-	-
	Dragendorf LP	-	-	-
	Bouchardat LP	-	-	-
Flavonoid	Serbuk Mg +HCl 2N	-	-	-
	Serbuk Zn + HCl 2N	-	-	-
Glikon pada Glikosida	Molisch LP	+	+	+
Tanin	FeCl <sub>3</sub> 1%	+	+	-
	Gelatin	+	+	-
Saponin	Air panas	+	+	-
	+HCl 2N	+	+	-
Antrakuinon	NaOH 2N	-	-	-
Terpen	Lieberman-Bouchard	-	-	-



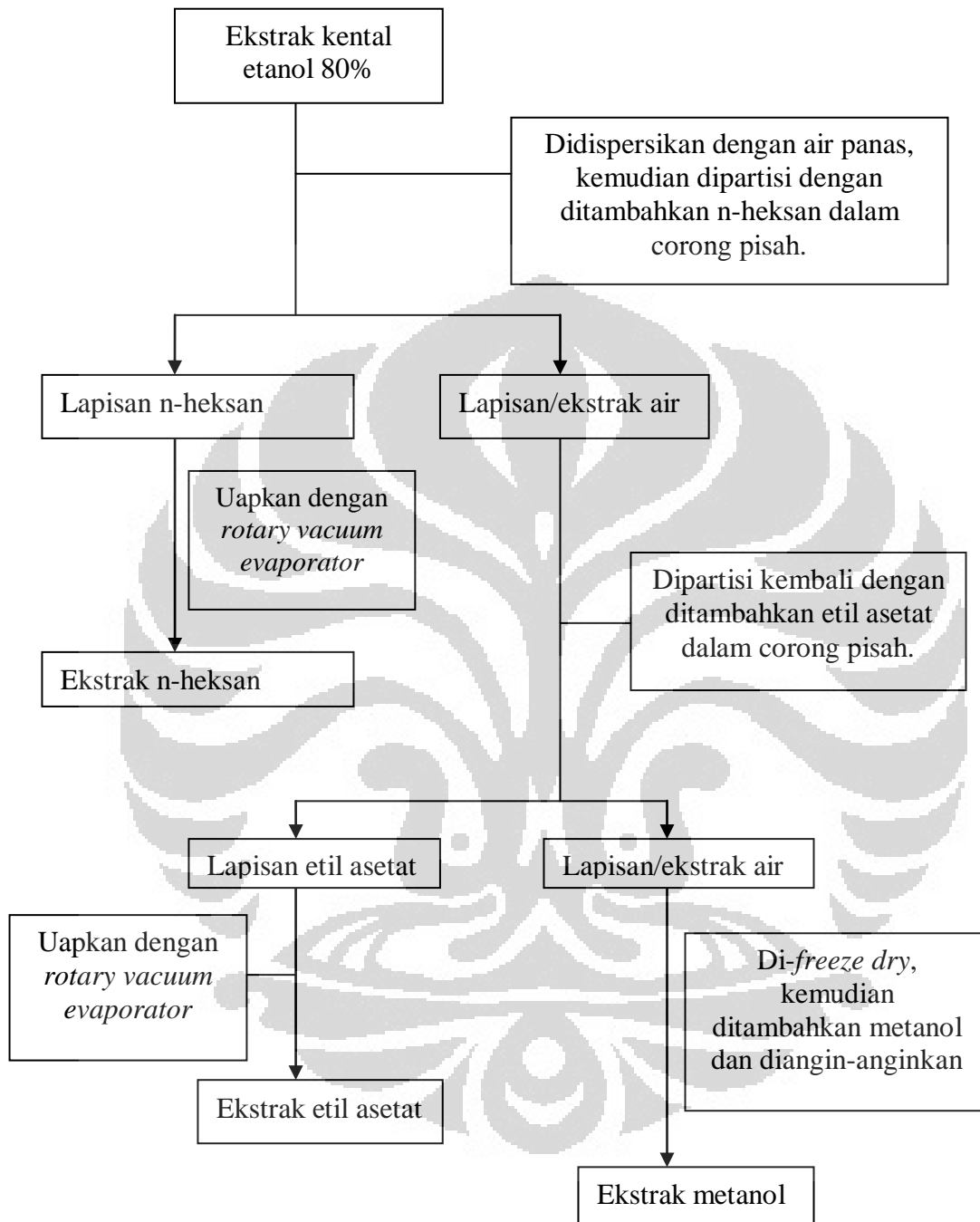
**Tabel 4.28** Hasil Identifikasi Golongan Senyawa Pada Ekstrak Etanol 80%, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi Teraktif Hasil Kolom Kayu Tuah Menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis

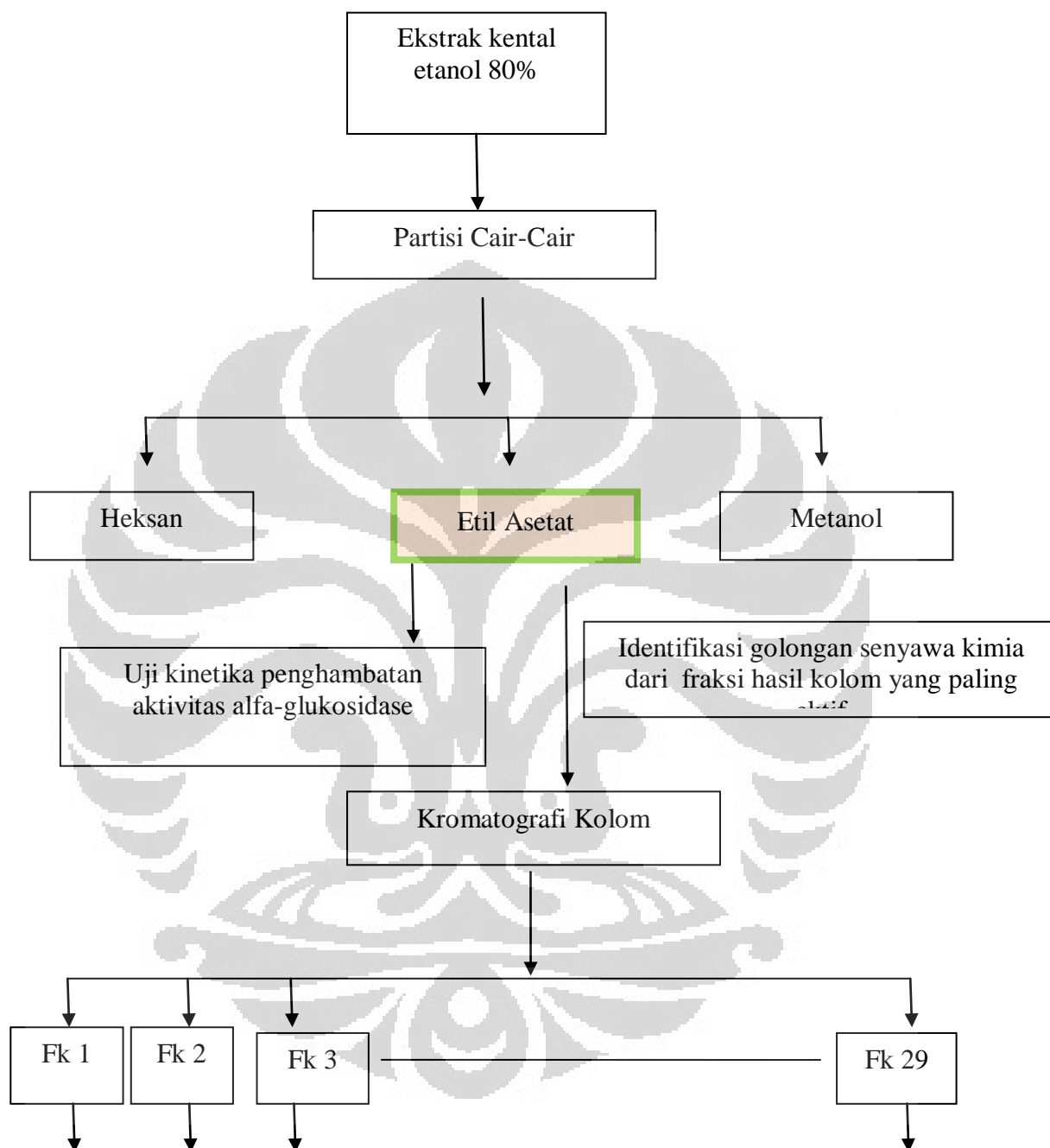
Golongan Senyawa		Standar	Kayu Tuah ( <i>Antidesma celebicum</i> Miq.)		
			Etanol 80%	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Hasil Kolom Teraktif (Fraksi E)
Alkaloid	Dragendorf LP	Chinae Cortex (merah-orang)	-	-	-
Flavonoid	AlCl <sub>3</sub>	<i>Justicia gendarussa</i> (kuning)	-	-	-
Tanin	FeCl <sub>3</sub> 1%	<i>Thea sinensis</i> (hitam)	+	+	+
Saponin	Anisaldehyd-asam sulfat	<i>Orthosiphon aristatus</i> (kuning) Liquiritae radix (ungu)	+	+	+
Antrakuinon	KOH 2N	Rhei radix (Berwarna merah keunguan)	-	-	-
Terpen	Vanilin-asam sulfat	<i>Caryophili flos</i> (ungu)	+	+	+

**Lampiran 1. Skema Prosedur Pelaksanaan**

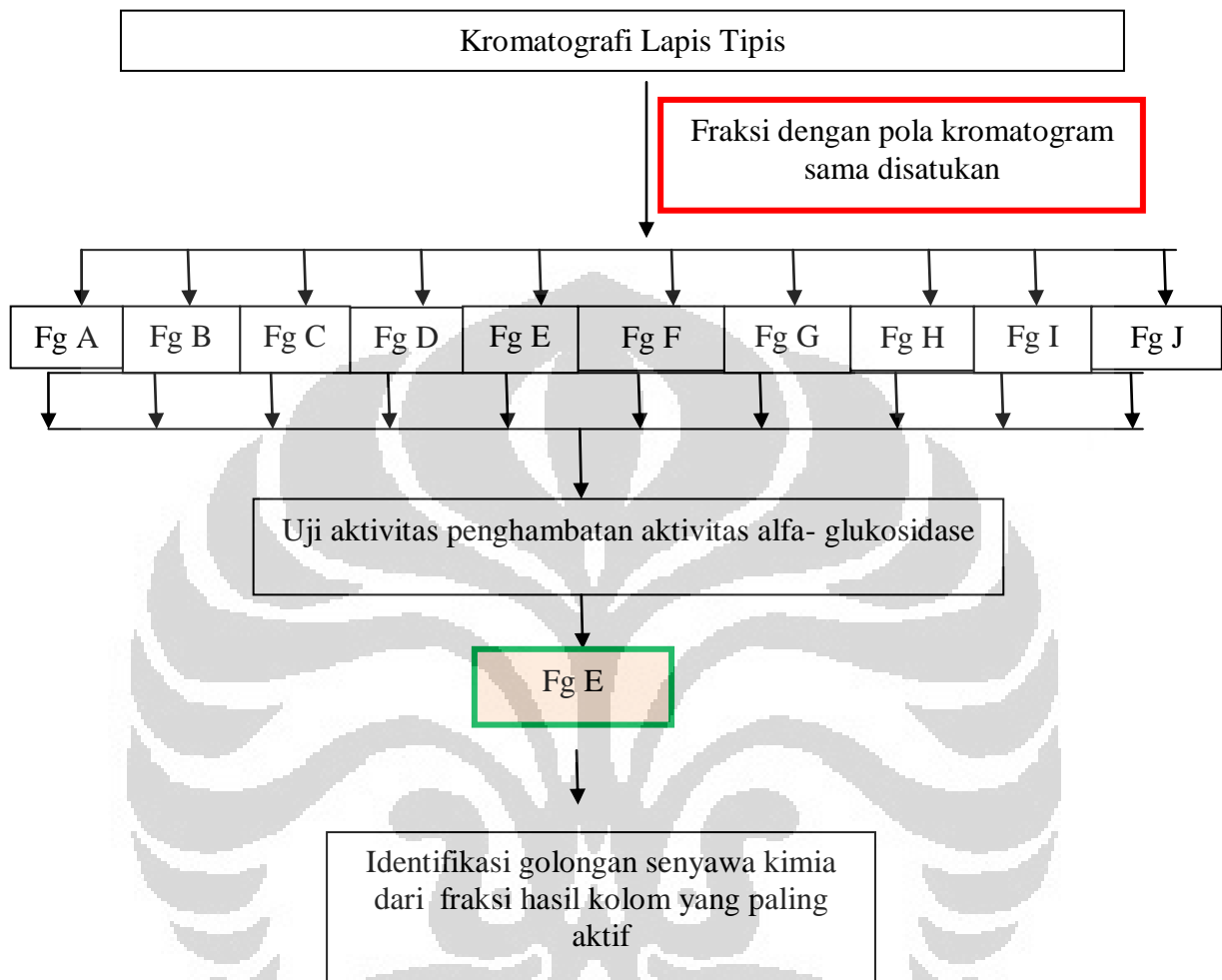
**Lampiran 2.** Skema Persiapan Sampel dan Ekstraksi

### Lampiran 3. Skema Fraksinasi



**Lampiran 4** Skema Kerja Ekstrak Kulit Batang Kayu Tuah

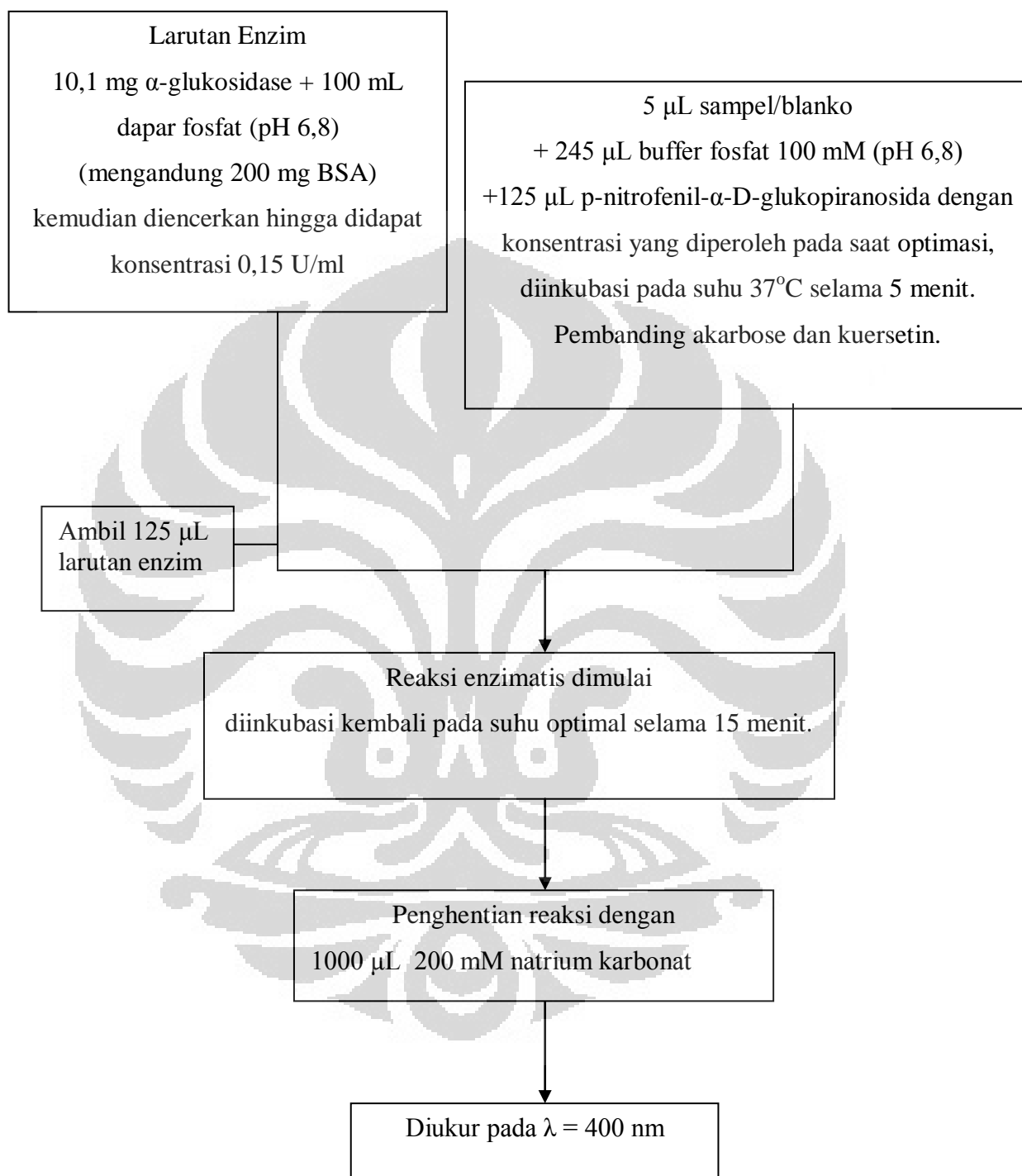
(lanjutan)

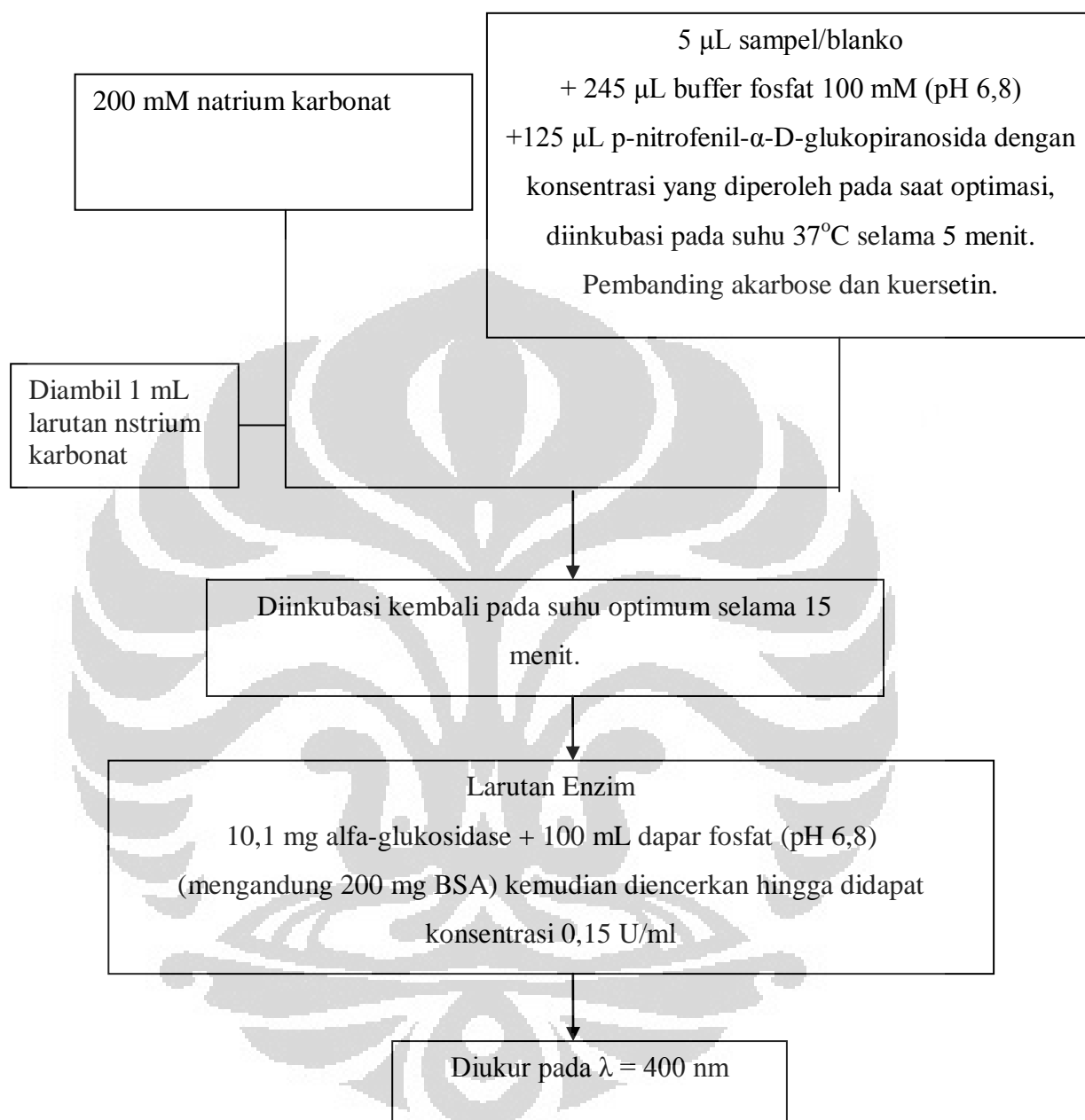


Keterangan: Fk : Fraksi kolom

Fg : Fraksi Gabungan

**Lampiran 5.** Skema Uji Aktivitas Penghambatan Alfa-Glukosidase (Blanko dan Sampel)



**Lampiran 6.** Skema Uji Aktivitas Penghambatan Alfa-Glukosidase (Kontrol)



### Lampiran 7. Perhitungan Unit Enzim Alfa-Glukosidase

Data pada kemasan alfa glukosidase adalah 16,1 mg; 26 % protein; 179 Unit/mg protein.

$$\text{Jumlah protein} = \frac{26}{100} \times 16,1 \text{ mg serbuk} = 4,186 \text{ mg protein.}$$

Perbandingan jumlah protein dengan total massa serbuk

$$\frac{1 \text{ mg protein}}{3,85 \text{ mg serbuk}} = \frac{4,186 \text{ mg protein}}{16,1 \text{ mg serbuk}}$$

$$\rightarrow 1 \text{ mg protein} \sim 3,85 \text{ mg serbuk} \sim 179 \text{ unit}$$

$$\frac{16,1 \text{ mg serbuk}}{3,85 \text{ mg serbuk}} \times 179 \text{ Unit} = 748,55 \text{ Unit}$$

Jadi, dalam 1 kemasan alfa glukosidase mengandung 748,55 Unit.

Berdasarkan data dari Sigma, larutan enzim yang digunakan adalah 0,15 U/mL. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan perhitungan untuk memperoleh jumlah serbuk yang akan ditimbang.

$$\frac{0,15 \text{ Unit}}{179 \text{ Unit}} \times 3,85 \text{ mg serbuk} = 0,03 \text{ mg serbuk}$$

Penimbangan enzim dengan jumlah 0,03 mg terlalu kecil jika digunakan timbangan analitik yang memiliki kemampuan menimbang minimum 10,0 mg. Sehingga, dilakukan penimbangan 10,1 mg serbuk enzim dengan perhitungan unit. Sebagai berikut:

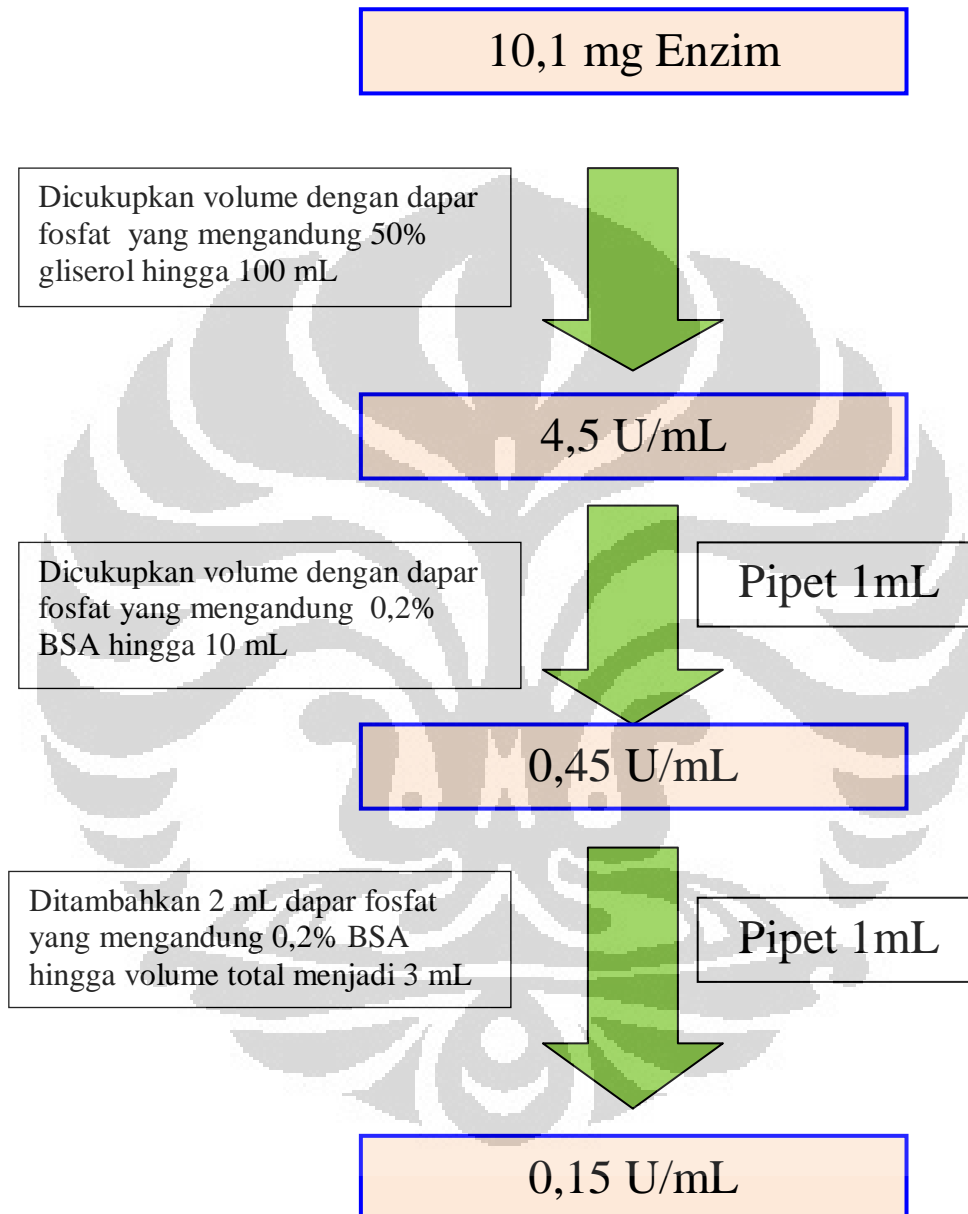
Penimbangan enzim untuk pengujian sejumlah 10,1 mg serbuk enzim

$$\frac{10,1 \text{ mg serbuk}}{3,85 \text{ mg serbuk}} \times 179 \text{ Unit} = 469,58 \text{ Unit}$$

$$\frac{469,58 \text{ Unit}}{100 \text{ mL}} = 4,6958 \text{ Unit / mL}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, larutan induk 4,6958 Unit/mL dapat dibuat dengan cara melarutkan 10,1 mg alfa-glukosidase dengan larutan BSA dengan pH 6,8 secukupnya hingga 100,0 mL.

**Lampiran 8** Skema Pembuatan Larutan Enzim Alfa Glukosidase 0,15 U/mL

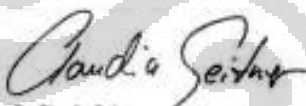


$$df = \frac{10}{1} \times \frac{3}{1} = 30$$



## Lampiran 9. COA Alfa-Glukosidase

Certificate of Analysis		
SIGMA-ALDRICH		
Product Name	$\alpha$ -Glucosidase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , recombinant, expressed in unspecified host, lyophilized powder, $\geq 125$ units/mg protein	
Product Number	G0660	
Product Brand	SIGMA	
CAS Number	9001-42-7	
<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>	<b>LOT 129K1426 RESULTS</b>
% Protein (Biuret)	$\geq 10$	26
units/mg protein	$\geq 125$	179
	One unit will liberate 1.0 micromole of D-Glucose from P-Nitrophenyl Alpha-D-Glucoside per minute at pH 6.8 at 37 deg C.	
units/mg protein	$\geq 50$	114
	One unit will convert 1.0 micromole of Maltose to 2.0 micromoles of D-Glucose per minute at pH 6.0 at 25 deg C.	
Recommended Retest Period	4 years	
Specification Date:	APR 2009	
Date of QC Release:	JAN 2010	
Recommended Retest Date:	DEC 2013	
Print Date:	JAN 25 2010	
 Rodney Burbach, Manager Quality Control St. Louis, Missouri USA		

Lampiran 10. COA Substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG)

SIGMA-ALDRICH		SIGMA	
		Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland Tel: +41 81 755 2011 Fax: +41 81 750 5445	
<b>Certificate of Analysis</b>			
Product Name:	4-NITROPHENYL $\alpha$ -D-GLUCOPYRANOSIDE		
	≥ 99 %		
Product Number:	N1377		
Product Brand:	Sigma		
Molecular Formula:	$C_{12}H_{13}NO_5$		
Molecular Mass:	301.25		
CAS Number:	3767-28-0		
<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>	<b>LOT BCBG2931V RESULTS</b>	
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF-WHITE	WHITE	
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER	
PURITY (TLC AREA %)	≥ 99 %	99.0 %	
SPECIFIC ROTATION (20D)	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	09AUG11		
RECOMMENDED RETEST DATE	JUL16		
 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	

**Lampiran 11.** Hasil Determinasi Kulit Batang Kayu Tuah (*Antidesma celebicum* Miq.) oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)

 <p><b>LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA</b>  <b>( Indonesian Institute of Sciences )</b>  <b>PUSAT KONSERVASI TUMBUHAN - KEBUN RAYA BOGOR</b>  <b>( Center for Plant Conservation - Bogor Botanical Gardens )</b>          Jalan Ir. H. Juanda No. 13, P.O. BOX 309 Bogor 16003, Indonesia          Telepon (0251) 8322187 - 8321857 - 8322220 - 8311362, 8352519, Fax. 62 (251) 8322187, 8313985          e-mail : kribilpi@indosat.net.id</p>	
Bogor, 24 Maret 2012	
No.	267 /IPH.3.02/KS/III/2012
Lampiran	
Kal	: Keterangan determinasi
Kepada Yth. : Sdri. Febriyanti NPM. 0806398190 Fakultas Farmasi Universitas Indonesia Depok	
Dengan hormat,  Dengan ini kami sampaikan bahwa spesimen tumbuhan yang diambil dari Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor, LIPI adalah dari jenis kulit batang <i>Antidesma celebicum</i> Miq., yang merupakan anggota Suku Euphorbiaceae.  Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.	
 Kepala Bidang Konservasi Ex-situ Dr. Joso Ridho Witono NIP. 197010091994031004	

