



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS  
ENZIM ALFA-GLUKOSIDASE DAN IDENTIFIKASI  
GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI FRAKSI  
TERAKTIF DAUN BUNI (*Antidesma bunius* L.)**

**SKRIPSI**

**BIANCA LORANZA  
0806397995**

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



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS  
ENZIM ALFA-GLUKOSIDASE DAN IDENTIFIKASI  
GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI FRAKSI  
TERAKTIF DAUN BUNI (*Antidesma bunius* L.)**

**SKRIPSI**

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

**BIANCA LORANZA  
0806397995**

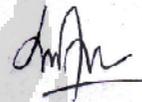
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI  
DEPOK  
JULI 2012**

## SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

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

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

Depok, Juli 2012



Bianca Loranza

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Bianca Loranza

NPM : 0806397995

Tanda Tangan : 

Tanggal : Juli 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Bianca Loranza  
NPM : 0806397995  
Program Studi : Sarjana Farmasi  
Judul Skripsi : Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Alfa-Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif Daun Buni (*Antidesma bunius* L.)

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., MSi. (  )  
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 : Juli 2012

## KATA PENGANTAR

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

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

- 1) Ibu Dr. Berna Elya, M.Si., Apt selaku dosen pembimbing akademik dan dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi;
- 2) Ibu Dr. Amarila Malik, M.S., Apt selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini;
- 3) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
- 4) Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Departemen;
- 5) Kedua orang tua, Papa Edi dan Mama Dini yang tak pernah henti mendoakan demi kelancaran dan kesuksesan skripsi yang telah dijalani;
- 6) Kakak Echa, Nenek, Tete Ayu, dan seluruh keluarga yang selalu membantu, mendoakan, dan memberi semangat.
- 7) Teman terdekat, Dimas yang selalu menemani dan memberikan semangat tiada henti.
- 8) Teman-teman Farmasi 2008, khususnya Majang, Anes, Thia, Novia, Suesti, Nita, dan Winie yang selalu berbagi selama masa perkuliahan dan penelitian; sahabat seperjuangan, Purwa dan Febriyanti yang selalu bersama dan berbagi

selama penelitian ini; kakak-kakak yang telah berbagi, khususnya Devi, kak Eva, kak Wulan, dan kak Anas; teman-teman Laboratorium Penelitian Fito-kimia dan Wisma Asri yang selalu memberi semangat dan berbagi dalam suka dan duka, serta para laboran dan pak satpam yang telah membantu kelancaran penelitian ini.

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

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

Penulis

Juli 2012

## KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

---

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

Nama : Bianca Loranza  
NPM : 0806397995  
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 Penghambatan Aktivitas Enzim Alfa-Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif Daun Buni (*Antidesma bunius* L.)

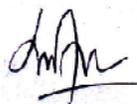
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : Juli 2012

Yang menyatakan



( Bianca Loranza )

## ABSTRAK

Nama : Bianca Loranza  
Program Studi : S1 Farmasi  
Judul : Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Alfa-glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif Daun Buni (*Antidesma bunius* L.)

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang telah menjadi penyakit umum dan menjadi permasalahan yang cukup serius di dunia, terutama DM tipe 2. Pencegahan DM tipe 2 dapat dilakukan dengan menghambat  $\alpha$ -glukosidase sehingga absorpsi glukosa tertunda dan kadar glukosa *postprandial* menurun. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh fraksi dari ekstrak etanol 80% daun buni (*Antidesma bunius* L.) yang memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase paling tinggi dan mengidentifikasi golongan senyawa kimia. Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dilakukan pada tiga fraksi, yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol dengan mengukur absorbansi *p*-nitrofenol sebagai produk dari reaksi enzimatis pada panjang gelombang 400 nm. Hasil menunjukkan bahwa fraksi metanol memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase paling tinggi dengan nilai  $IC_{50}$  8,0434 ppm, dan mekanismenya adalah secara kompetitif. Hasil identifikasi golongan senyawa fraksi metanol menunjukkan adanya flavonoid, tannin, saponin, dan gula. Ekstrak metanol di kromatografi kolom dan fraksi hasil kolom di KLT untuk melihat profil kromatogram. Fraksi gabungan yang terbentuk adalah 6 fraksi. Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dilakukan pada keenam fraksi gabungan tersebut. Hasil menunjukkan bahwa fraksi gabungan VI (etil asetat : metanol (60:140); (40:160); (20:180); (0:200)) memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan nilai  $IC_{50}$  4,7863 ppm dan terdapat senyawa gula dan flavonoid.

Kata Kunci : *Antidesma bunius* L., daun buni, diabetes melitus, penghambat  $\alpha$ -glukosidase.  
xv + 99 halaman : 31 gambar; 28 tabel; 8 lampiran  
Daftar Pustaka : 53 (1966-2012)

## ABSTRACT

Name : Bianca Loranza  
Program Study : S1 Pharmacy  
Title : Enzyme Inhibition Test of  $\alpha$ -glucosidase Activity and Phytochemical Identification from The Most Active Fraction of Buni (*Antidesma bunius* L.) Leaves.

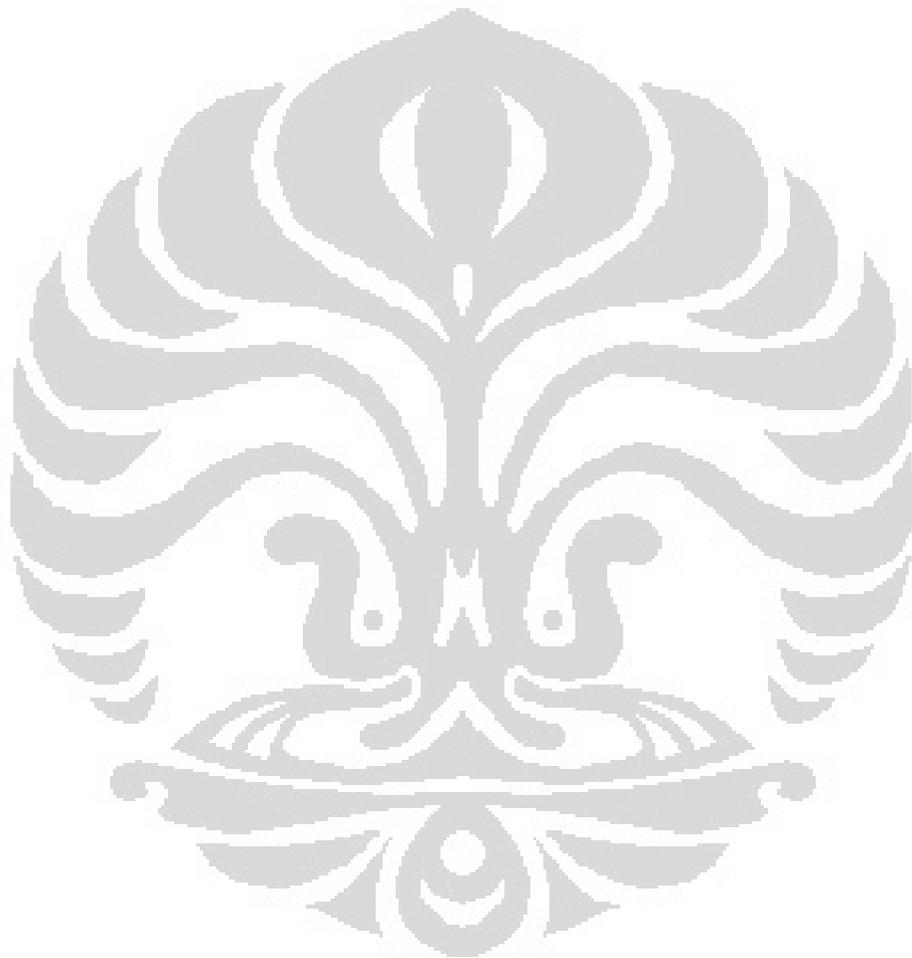
Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder that has become a common disease and a serious problem in the world, especially type 2 DM. Prevention of type 2 diabetes could be done by inhibiting  $\alpha$ -glucosidase enzymes so that resulting delayed of glucose absorption and postprandial glucose levels were decreased. This study aims to get the fraction of buni leaves extract that has the highest potential to inhibit the activity of  $\alpha$ -glucosidase enzymes and identify phytochemical compounds. Test of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity was done on three fractions, there are n-hexane, ethyl acetate, and methanol by measuring the absorbance of *p*-nitrophenol as a product of the enzymatic reaction at a wavelength 400 nm. The test result showed that the methanol fraction had the highest inhibition against  $\alpha$ -glucosidase activity with IC<sub>50</sub> value of 8.0434 ppm, and the mechanism is competitive. The result of phytochemical identification showed there are flavonoids, tannins, saponins, and sugar in methanol fraction. Methanol fraction was fractionated by column chromatography and the fraction of the column were combined become six fractions by the profile of chromatogram. The results showed that the fraction VI (ethyl acetate : methanol (60:140); (40:160); (20:180); (0:200)) has the highest  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity with IC<sub>50</sub> value of 8.0434 ppm and contains sugar and flavonoids.

Key words : *Antidesma bunius* L., buni leaves, diabetes mellitus,  $\alpha$ -glucosidase inhibitor.  
xv + 99 pages : 17 pictures; 31 tables, 8 appendix  
References : 53 (1966-2012)

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b>	
<b>HALAMAN 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 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 TABEL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xv</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	3
1.3 Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Diabetes Melitus .....	4
2.2 Penatalaksanaan Terapi Diabetes melitus .....	5
2.3 Penghambat $\alpha$ -glukosidase .....	8
2.4 Antidesma bunius (Buni) .....	10
2.5 Simplisia, ekstrak, dan ekstraksi .....	12
2.6 Enzim .....	15
2.7 Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -glukosidase .....	19
2.8 Spektrofotometri UV-Vis .....	20
2.9 Kromatografi Lapis Tipis .....	21
2.10 Kromatografi kolom .....	23
2.11 Identifikasi golongan senyawa kimia fraksi aktif .....	24
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>27</b>
3.1. Lokasi dan Waktu .....	27
3.2. Alat .....	27
3.3. Bahan .....	27
3.4. Prosedur Pelaksanaan .....	32
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>47</b>
4.1. Penyiapan Bahan Uji .....	47
4.2 Uji Pendahuluan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase .....	49
4.3 Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase.....	53
4.4 Fraksinasi menggunakan Kromatografi Kolom .....	56

4.5	Penggabunga Fraksi Kolom.....	57
4.6	Uji Kinetika Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase .....	57
4.7	Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase Fraksi Kolom .....	59
4.8	Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi Teraktif.....	59
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>		<b>64</b>
5.1.	Kesimpulan.....	64
5.2.	Saran .....	64
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>65</b>



## DAFTAR TABEL

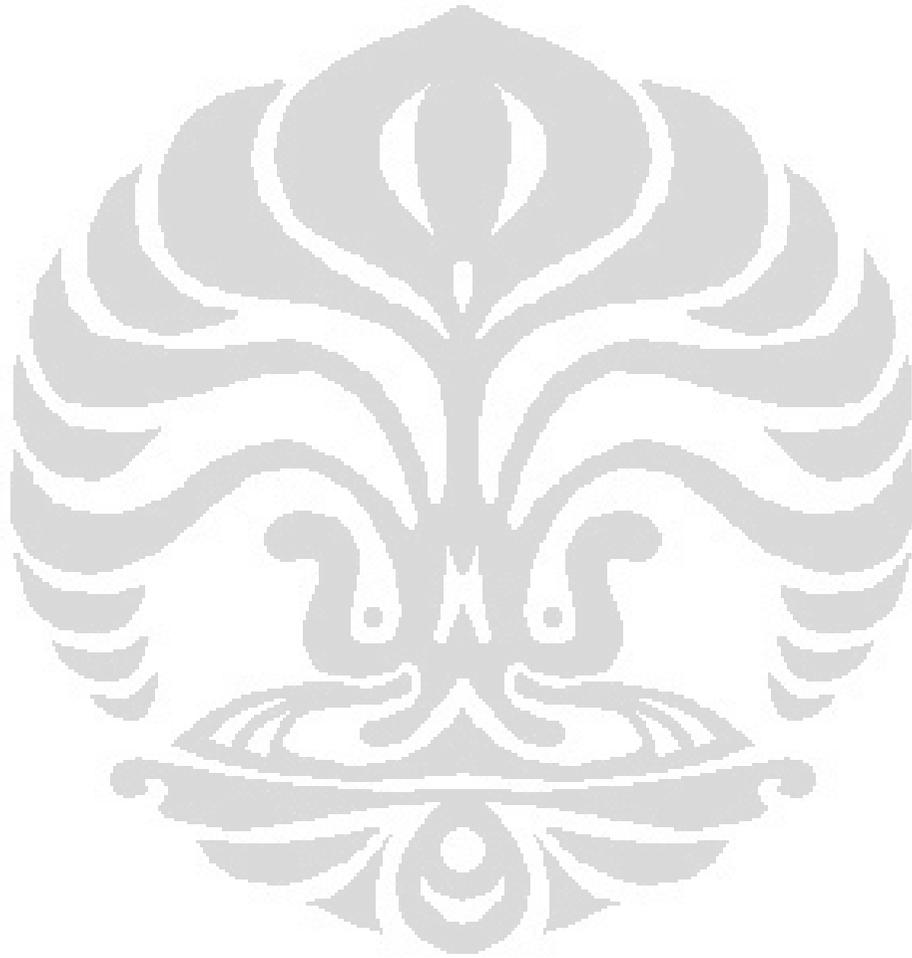
Tabel 2.1	Zat Penyerap untuk Kromatografi Lapisan Tipis .....	22
Tabel 3.1	Prosedur Penentuan Panjang Gelombang p-nitrofenol .....	35
Tabel 3.2	Prosedur Optimasi Konsentrasi Substrat .....	36
Tabel 3.3	Prosedur Optimasi Konsentrasi pH .....	37
Tabel 3.4	Prosedur Optimasi Konsentrasi Suhu .....	38
Tabel 3.5	Prosedur Uji Aktivitas Penghambat $\alpha$ -Glukosidase .....	40
Tabel 3.6	Prosedur Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim .....	42
Tabel 4.1	Rendemen Ekstrak Etanol Tanaman Uji .....	69
Tabel 4.2	Berat Ekstrak Hasil Fraksinasi .....	69
Tabel 4.3	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Konsentrasi Substrat 1; 2; 2,5; 5; 15; 10; 20; 30 mM dengan larutan enzim 0,15U/mL, waktu inkubasi 15 menit dan pH 6,8.....	70
Tabel 4.4	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi pH (6,6);(6,8); (7,0); (7,2)....	71
Tabel 4.5	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Suhu 30,37, dan 40 <sup>0</sup> C.....	71
Tabel 4.6	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Akarbose (sebagai Pembanding) .....	72
Tabel 4.7	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Kuersetin (sebagai Pembanding) .....	73
Tabel 4.8	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Heksan .....	74
Tabel 4.9	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Etil Asetat .....	75
Tabel 4.10	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Metanol.....	76
Tabel 4.11	Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Enzim Fraksi Metanol (Fraksi Teraktif) .....	77
Tabel 4.12	Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten Fraksi Metanol 8,375 ppm .....	78
Tabel 4.13	Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten Fraksi Metanol 8,375 ppm .....	78
Tabel 4.14	Perbandingan eluen kromatografi kolom.....	79
Tabel 4.15	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan I.....	80
Tabel 4.16	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan II .....	81
Tabel 4.17	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan III.....	82
Tabel 4.18	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan IV .....	83
Tabel 4.19	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan V .....	84
Tabel 4.20	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan VI.....	85
Tabel 4.21	Hasil Identifikasi Golongan Senyawa Kimia.....	85
Tabel 4.22	Nilai Rf Bercak yang Positif Gugus Fenol .....	60
Tabel 4.23	Nilai Rf Bercak yang Positif Golongan Flavonoid .....	61
Tabel 4.24	Nilai Rf Bercak yang Positif Golongan Flavonoid .....	62

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur Kimia Akarbose .....	9
Gambar 2.2	Pohon <i>Antidesma bunius</i> L.....	10
Gambar 2.3	Daun <i>Antidesma bunius</i> L .....	10
Gambar 2.4	Plot Lineweaver-Burk .....	17
Gambar 2.5	Plot Lineweaver-Burk dari Inhibisi Kompetitif .....	18
Gambar 2.6	Plot Lineweaver-Burk dari Inhibisi Non Kompetitif.....	19
Gambar 2.7	Reaksi enzimatis $\alpha$ -Glukosidase dan p-nitrofenil- $\alpha$ -D- glukopiranosida.....	20
Gambar 4.1	Kurva Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Konsentrasi Substrat hingga 30 mM.....	51
Gambar 4.2	Kurva Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi pH .....	52
Gambar 4.3	Kurva Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Suhu.....	53
Gambar 4.4	Grafik Perbandingan Nilai IC <sub>50</sub> .....	56
Gambar 4.5	Plot Lineweaver-Burk Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Metanol Daun Buni 8,375 ppm(0,25%).....	59
Gambar 4.6	Identifikasi Fenol dengan FeCl <sub>3</sub> .....	86
Gambar 4.7	Identifikasi Fenol menggunakan KLT .....	87
Gambar 4.8	Identifikasi Tanin dengan gelatin.....	88
Gambar 4.9	Identifikasi Flavonoid menggunakan KLT.....	89
Gambar 4.10	Identifikasi Saponin .....	90

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Perhitungan Unit Larutan $\alpha$ -Glukosidase dan Pengenceran .....	91
Lampiran 2	Skema Prosedur Kerja .....	93
Lampiran 3	Skema Tahap Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase .....	94
Lampiran 4	Skema Fraksinasi Partisi Cair-cair .....	95
Lampiran 5	Surat Determinasi Tanaman .....	96
Lampiran 6	Sertifikat Analisis $\alpha$ -Glukosidase .....	97
Lampiran 7	Sertifikat Analisis Substrat <i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida .....	98
Lampiran 8	Skema Ringkasan Kerja .....	99



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang telah menjadi penyakit umum di negara maju maupun negara berkembang, dan menjadi permasalahan yang cukup serius di dunia. Penyakit tersebut berada pada peringkat ketiga sebagai penyakit yang menyebabkan kematian, setelah kanker dan kardiovaskular (Guo, Jiang, Lv, & Wang, 2010). Pada tahun 2005, jumlah pasien diabetes melitus di seluruh dunia diperkirakan sekitar 150 juta, dan jumlah tersebut akan terus meningkat menjadi 220 juta pada tahun 2010, dan 300 juta pada tahun 2025 (Kim, Nam, Kurihara, & Kim, 2008). Jumlah penderita diabetes melitus tersebut didominasi oleh pasien penderita DM tipe 2 (Lam, Chen, Kang, Chen, & Lee, 2008).

Hiperglikemia *postprandial* berperan penting dalam perkembangan DM tipe 2 dan komplikasi yang terjadi (Kim, Nam, Kurihara, & Kim, 2008). Sehingga, penderita DM tipe 2 ini harus menghadapi terapi sepanjang hidupnya untuk mengontrol hiperglikemia dan mencegah terjadinya komplikasi (Tahrani & Barnett, 2010). Kecenderungan peningkatan jumlah penderita DM tipe 2 ini menjadi perhatian medis dunia yang serius yang mendorong dilakukannya berbagai usaha dalam meneliti agen terapeutik baru.

Mengontrol kadar glukosa *postprandial* merupakan strategi penting dalam pencegahan DM tipe 2 (Yuhao, 2005) sehingga dapat dilakukan pendekatan terapeutik dengan menunda absorpsi glukosa dengan cara menghambat enzim hidrolisis karbohidrat, seperti  $\alpha$ -glukosidase pada organ pencernaan.

Senyawa-senyawa inhibitor  $\alpha$ -glukosidase bekerja menghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase yang terdapat pada dinding usus halus. Enzim-enzim  $\alpha$ -glukosidase (maltase, isomaltase, glukomaltase dan sukrase) berfungsi untuk menghidrolisis oligosakarida dan disakarida pada dinding usus halus. Inhibisi kerja enzim ini secara efektif dapat mengurangi pencernaan karbohidrat kompleks dan absorpsinya, sehingga dapat mengurangi peningkatan kadar glukosa *postprandial* pada penderita diabetes (Shinde et al., 2008).

Beberapa inhibitor yang saat ini telah digunakan secara klinis adalah akarbose dan miglitol yang menghambat glikosidase seperti,  $\alpha$ -glukosidase dan  $\alpha$ -amilase. Namun, banyak agen hipoglikemik memiliki keterbatasan, yaitu menimbulkan efek samping dan meningkatkan komplikasi diabetes. Efek samping yang utama dari inhibitor  $\alpha$ -glukosidase pada gastrointestinal antara lain adalah kembung, mual, diare, dan flatulensi. Inhibitor  $\alpha$ -glukosidase alami yang berasal dari bahan alam dapat dimanfaatkan menjadi pendekatan terapi untuk mengobati hiperglikemia *postprandial* karena memiliki efek samping yang rendah dan harganya lebih terjangkau daripada obat antihiperglikemik sintetik (P Sudha, 2011).

Tanaman merupakan sumber yang kaya akan inhibitor  $\alpha$ -glukosidase (Gholamhoseinian, Fallah, & Sharififar, 2009) serta memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang kuat, sehingga dapat digunakan untuk terapi hiperglikemia *postprandial* yang efektif (Nguyen et al., 2010). Hal tersebut menyebabkan banyak dilakukan penelitian untuk mencari inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari tanaman, dalam rangka mengembangkan fungsi fisiologis makanan untuk mengobati diabetes melitus (Gao, Huang, Gao, Xu, Inagaki & Kawabata, 2008).

Buni (*Antidesma bunius* L.) merupakan salah satu tanaman yang banyak terdapat di Indonesia, khususnya di pulau Jawa. Namun, khasiatnya belum banyak diketahui. Berdasarkan penelitian Elya, Basah, Mun'im, Yuliatuti, Bangun, & Septiana (2012), disebutkan bahwa ekstrak etanol 80% daun *Antidesma bunius* L. memiliki potensi menghambat kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan nilai  $IC_{50}$  7,94 ppm. Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini dilakukan untuk menguji fraksi yang memiliki potensi menghambat kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase paling tinggi dan mengidentifikasi golongan senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi tersebut.

Pada penelitian ini, ekstraksi dilakukan dengan metode refluks menggunakan etanol 80%. Ekstrak yang telah didapatkan difraksinasi dengan cara partisi cair-cair dimulai dengan pelarut non-polar sampai pelarut polar, yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol. Ketiga fraksi tersebut diukur aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase menggunakan substrat *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-

glukopiranosida (PNPG) dengan metode spektrofotometri. Penghambatan reaksi enzimatik tersebut akan menghasilkan *p*-nitrofenol (berwarna kuning) yang diukur serapannya pada panjang gelombang 400 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Palanisamy, Manaharan, Teng, Radhakrishnan, Subramaniam, & Masilamani, 2011). Nilai  $IC_{50}$  (konsentrasi ekstrak yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase pada kondisi pengujian) ketiga fraksi dibandingkan dengan nilai  $IC_{50}$  pembanding (akarbose dan kuersetin). Fraksi yang memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase paling tinggi diidentifikasi kandungan golongan senyawa kimianya dan dilakukan pemisahan kembali menggunakan kromatografi kolom dengan bantuan vakum. Setelah diperoleh fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom, dilakukan kromatografi lapis tipis untuk mendapatkan pola kromatogram dari tiap fraksi. Fraksi yang memiliki pola kromatogram yang sama digabung dan diuji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan metode spektrofotometri. Selanjutnya, dilakukan penapisan fitokimia pada fraksi gabungan yang memiliki aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase paling tinggi.

## 1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

- a. Memperoleh fraksi hasil partisi cair-cair dan fraksi hasil kromatografi kolom vakum yang memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tertinggi dari ekstrak etanol 80% daun buni.
- b. Mengetahui mekanisme penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dari fraksi hasil partisi cair-cair.
- c. Mengetahui golongan senyawa kimia dari fraksi teraktif.

## 1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah melengkapi data mengenai potensi antidiabetes ekstrak daun buni (*Antidesma bunius* L.) sehingga dapat menjadi acuan untuk penelitian selanjutnya dan meningkatkan penggunaan bahan alam sebagai bahan obat diabetes, khususnya daun buni.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Diabetes melitus**

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

Diabetes melitus (DM) didefinisikan sebagai suatu penyakit atau gangguan metabolisme kronis yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid dan protein sebagai akibat gangguan sekresi insulin oleh sel-sel  $\beta$  Langerhans kelenjar pankreas, aksi insulin terhadap jaringan target yang mengakibatkan insensitivitas sel terhadap insulin, ataupun keduanya (Si et al, 2010).

Umumnya, diabetes melitus diklasifikasikan menjadi 4 tipe, diantaranya ialah sebagai berikut :

##### **2.1.1.1 Diabetes melitus tipe 1**

DM tipe 1 atau biasa disebut diabetes melitus dependen insulin (DMDI) adalah penyakit hiperglikemia akibat ketiadaan absolut insulin. DM tipe 1 diperkirakan timbul akibat destruksi otoimun sel-sel beta pulau Langerhans. Serangan otoimun dapat timbul setelah infeksi virus, misalnya gondongan, rubella, sitomegalovirus kronik, atau setelah pajanan obat atau toksin. Pengidap penyakit ini harus mendapat insulin pengganti. (Corwin, 2001).

##### **2.1.1.2 Diabetes melitus tipe 2**

Diabetes melitus tipe 2 merupakan penyakit hiperglikemia akibat insensitivitas sel terhadap insulin. Kadar insulin mungkin sedikit menurun atau berada dalam rentang normal. Namun, karena insulin tetap dihasilkan oleh sel-sel beta pankreas, maka diabetes tipe 2 dianggap sebagai noninsulin dependent diabetes melitus (NIDDM).

DM tipe 2 berkaitan dengan kegemukan. Selain itu, pengaruh genetik, yang menentukan kemungkinan seseorang mengidap penyakit ini, cukup kuat. Diperkirakan bahwa terdapat suatu sifat yang belum teridentifikasi yang menyebabkan pankreas mengeluarkan insulin yang berbeda, atau menyebabkan

reseptor insulin tidak dapat berespon secara kuat terhadap insulin. Mungkin juga terdapat kaitan genetik antara kegemukan dan rangsangan berkepanjangan reseptor-reseptor insulin yang mengakibatkan penurunan jumlah reseptor insulin yang terdapat di sel-sel (Corwin, 2001).

#### 2.1.1.3 Diabetes melitus Gestasional

Diabetes melitus gestasional adalah diabetes yang timbul selama kehamilan. Penyebab diabetes melitus gestasional meliputi perubahan metabolik dan hormon, dimana kadar gula darah pada pasien dengan diabetes tipe ini sering kali kembali normal setelah melahirkan.

Pada penyakit diabetes gestasional ini, kebutuhan kadar estrogen, energi, dan hormon pertumbuhan selama kehamilan meningkat sehingga mengakibatkan perangsangan pengeluaran insulin dan dapat menyebabkan sekresi insulin yang berlebihan seperti diabetes tipe II yang akhirnya menyebabkan penurunan responsivitas sel. Diabetes gestasional dapat menimbulkan efek negatif pada kehamilan dengan meningkatkan risiko malformasi kongenital, lahir mati, dan bayi bertubuh besar, yang dapat menimbulkan masalah pada persalinan (Corwin, 2001).

#### 2.1.1.4 Diabetes Tipe Lain

Diabetes tipe lain adalah diabetes yang jarang terjadi dan umumnya disebabkan oleh adanya infeksi, efek samping obat, endokrinopati, kerusakan pankreas serta kelainan genetik (Dipiro et al., 2005).

### 2.2 Penatalaksanaan Terapi Diabetes melitus

Tujuan terapi diabetes melitus antara lain secara langsung menurunkan gejala, menurunkan onset, dan pergerakan komplikasi dari retinopati, nefropati, dan neuropati, terapi intensif yang berhubungan dengan faktor resiko kardiovaskular, dan memperbaiki kualitas dan kuantitas hidup (Dipiro et al., 2005). Penatalaksanaan terapi untuk mengelola diabetes melitus terdiri dari terapi non farmakologi dan terapi farmakologi.

## 2.2.1 Terapi Non-Farmakologi

### 2.2.1.1 Diet

Diet yang baik merupakan kunci keberhasilan penatalaksanaan diabetes. Diet yang dianjurkan adalah makanan dengan komposisi yang seimbang dalam hal karbohidrat, protein dan lemak. Jumlah kalori disesuaikan dengan pertumbuhan, status gizi, umur, stres akut dan kegiatan fisik, yang pada dasarnya ditujukan untuk mencapai dan mempertahankan berat badan ideal karena penurunan berat badan telah dibuktikan dapat mengurangi resistensi insulin dan memperbaiki respons sel-sel  $\beta$  terhadap stimulus glukosa (Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2005).

### 2.2.1.2 Olahraga

Berolahraga secara teratur dapat menurunkan dan menjaga kadar gula darah tetap normal karena dapat memperbanyak jumlah dan meningkatkan aktivitas reseptor insulin dalam tubuh dan juga meningkatkan penggunaan glukosa. Prinsipnya, tidak perlu olahraga berat, olahraga ringan asal dilakukan secara teratur akan sangat bagus pengaruhnya bagi kesehatan. Beberapa contoh olahraga yang disarankan, antara lain jalan atau lari pagi, bersepeda, berenang, dan lain sebagainya. (Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2005).

## 2.2.2 Terapi Farmakologi

Apabila penatalaksanaan terapi tanpa obat (pengaturan diet dan olahraga) belum berhasil mengendalikan kadar glukosa darah penderita, maka perlu dilakukan langkah berikutnya berupa penatalaksanaan terapi obat.

### 2.2.2.1 Terapi insulin

Terapi insulin merupakan satu keharusan bagi penderita DM Tipe 1. Pada DM Tipe I, sel-sel  $\beta$  Langerhans kelenjar pankreas penderita rusak, sehingga tidak lagi dapat memproduksi insulin. Sebagai penggantinya, maka penderita DM Tipe I harus mendapat insulin eksogen untuk membantu agar metabolisme karbohidrat di dalam tubuhnya dapat berjalan normal.

### 2.2.2.2 Obat Antidiabetes Oral

Obat-obat antidiabetes oral terutama ditujukan untuk membantu penanganan pasien DM Tipe II. Pemilihan obat antidiabetes oral yang tepat sangat menentukan keberhasilan terapi diabetes. Bergantung pada tingkat keparahan penyakit dan kondisi pasien, farmakoterapi hipoglikemik oral dapat dilakukan dengan menggunakan satu jenis obat atau kombinasi dari dua jenis obat. Pemilihan dan penentuan rejimen hipoglikemik yang digunakan harus mempertimbangkan tingkat keparahan diabetes (tingkat glikemia) serta kondisi kesehatan pasien secara umum termasuk penyakit-penyakit lain dan komplikasi yang ada (Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2005). Obat-obat antidiabetes oral diantaranya yaitu :

a. Golongan sulfonilurea

Mekanisme kerja obat golongan sulfonilurea adalah merangsang sekresi insulin dari granula sel-sel  $\beta$  langerhans pankreas (Departemen Farmakologi dan Terapi FKUI, 2007)

b. Golongan Biguanida

Mekanisme kerja obat golongan biguanida adalah menurunkan produksi glukosa di hepar, meningkatkan sensitivitas jaringan otot dan adipose terhadap insulin (Departemen Farmakologi dan Terapi FKUI, 2007).

c. Golongan Meglitinid

Mekanisme kerja golongan ini sama dengan sulfonilurea, golongan ini merangsang insulin dengan menutup kanal K yang ATP-independent sel  $\beta$  langerhans pankreas (Departemen Farmakologi dan Terapi FKUI, 2007).

d. Golongan Tiazolidindion

Mekanisme kerja obat golongan tiazolidindion adalah meningkatkan sensitivitas insulin pada otot dan jaringan adiposa dan hati dengan cara berikatan dengan PPAR $\gamma$  membentuk kompleks dan terbentuk GLUT yang baru (Departemen Farmakologi dan Terapi FKUI, 2007).

e. Golongan Penghambat  $\alpha$ -glukosidase

Mekanisme kerja obat golongan penghambat  $\alpha$ -glukosidase adalah menghambat kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase di *brush border intestin*. Mencegah peningkatan glukosa plasma pada orang normal dan pasien DM (Departemen Farmakologi dan Terapi FKUI, 2007).

### 2.3 Penghambat $\alpha$ -glukosidase

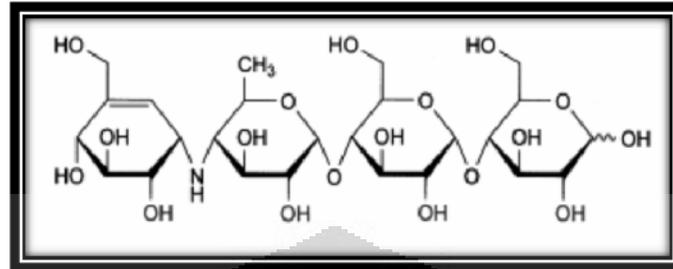
Pada proses pencernaan, karbohidrat kompleks akan dicerna oleh berbagai enzim pencernaan yang terdapat pada usus halus, termasuk enzim  $\alpha$ -glukosidase yang merupakan enzim karbohidrolase yang bekerja mengkatalisis pelepasan  $\alpha$ -glukosa (Zhang, Zheng, & Shen, 2007). Glukosa yang dilepas tersebut nantinya akan diabsorpsi pada lumen usus dan masuk ke dalam sirkulasi darah sehingga dapat menyebabkan hiperglikemia *postprandial* dan berujung pada DM tipe 2 (Luo, Wang, Wang, Ma, & Li, 2012). Penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase merupakan salah satu pendekatan terapeutik untuk menurunkan kadar glukosa darah *postprandial* (Manaharan, Appleton, Cheng, & Palanisamy, 2011) karena dengan dihambatnya kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase, maka dapat menunda penguraian oligosakarida dan disakarida menjadi monosakarida (Shinde et al., 2008) sehingga senyawa yang dapat menghambat kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase tersebut dapat digunakan sebagai obat oral untuk pasien DM Tipe 2.

Obat golongan penghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase ini tidak menyebabkan hipoglikemia dan tidak berpengaruh pada kadar insulin (Sudoyo, Setiyohadi, Alwi, K Simadibrata & Setiati, 2006). Penghambat  $\alpha$ -glukosidase dikontraindikasikan pada pasien dengan *short-bowel syndrome* atau inflamasi di usus besar (Dipiro et al., 2005) karena efek samping yang utama dari inhibitor  $\alpha$ -glukosidase pada gastrointestinal antara lain adalah kembung, mual, diare, dan flatulensi (P Sudha, 2011).

Obat antidiabetes oral yang termasuk golongan penghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase antara lain adalah akarbose, miglitol, dan voglibose. Namun, obat yang telah beredar di Indonesia adalah akarbose. Akarbose diperoleh dari proses fermentasi mikroorganisme *Actinoplanes utahensis*. Akarbose berupa serbuk berwarna putih atau putih kekuningan yang higroskopis, dengan berat molekul

Universitas Indonesia

646 dan sangat larut dalam air. Rumus empiriknya adalah  $C_{25}H_{43}NO_{18}$  dengan struktur kimia dapat dilihat pada Gambar 2.1 (British Pharmacopoeia Commission, 2009):



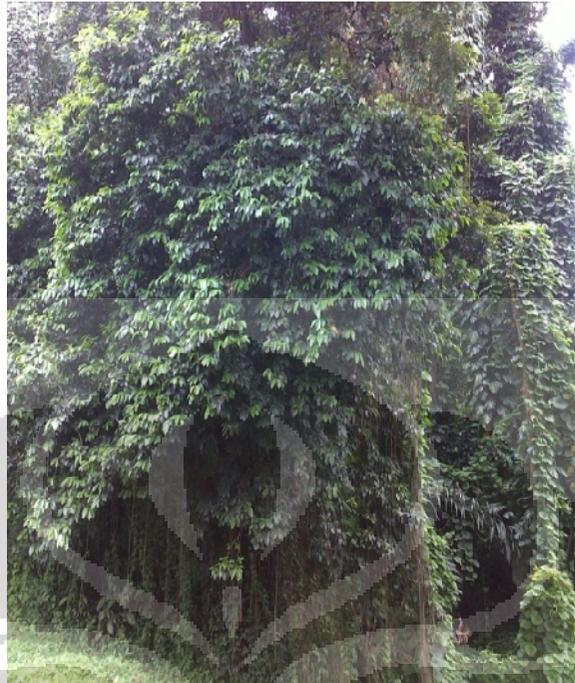
[Sumber : British Pharmacopoeia Commission, 2009]

**Gambar 2.1** Struktur Kimia Akarbose

Penggunaan akarbose sebagai obat antihiperqlikemia oral dimulai dengan dosis 25 mg satu kali sehari, kemudian ditingkatkan menjadi 50 mg tiga kali sehari, dan dapat ditingkatkan menjadi 100 mg tiga kali sehari jika diperlukan. Peningkatan dosis secara bertahap tersebut dapat dilakukan sampai dosis maksimum 200 mg tiga kali sehari (Sweetman, 2009).

Obat ini harus diberikan segera pada saat makanan utama untuk mencapai efek yang maksimal. Hal ini perlu dilakukan karena akarbose merupakan penghambat kompetitif dan sudah harus ada bersamaan dengan karbohidrat pada saat kerja enzimatik di usus halus (Sudoyo, Setiyohadi, Alwi, K Simadibrata & Setiati, 2006).

## 2.4 *Antidesma bunius* (Buni)



[Sumber : Koleksi pribadi ]

**Gambar 2.2** Pohon *Antidesma Bunius*



[Sumber : Koleksi pribadi]

**Gambar 2.3** Daun *Antidesma bunius*

#### 2.4.1 Klasifikasi (Jones & Luchsinger, 1987; Indonesian Institute of Sciences National Biological, 1985)

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta (Angiospermae)
Kelas	: Magnoliopsida (Dicotyledone)
Bangsa	: Euphorbiales
Suku	: Euphorbiaceae
Marga	: Antidesma
Jenis	: <i>Antidesma bunius</i> (L.) Spreng
Sinonim	: <i>Stilago bunius</i> L. <i>Antidesma rumphii</i> Tulase <i>Antidesma dallachyanum</i> Baillon
Nama Umum	: Buni
Nama Daerah	: Wuni (Jawa), Huni (Sunda)
Nama Asing	: Bignay, Chinese laurel, salamander tree (Inggris)

#### 2.4.2 Morfologi

Tumbuhan berupa pohon atau perdu dengan tinggi 15-30 m, memiliki banyak cabang (Orwa et al, 2009). Batang kasar atau halus berwarna cokelat, cokelat karamel, kuning cokelat keabu-abuan, atau abu-abu, biasanya terdapat retak atau terkadang terdapat benjolan kecil yang menyebar (Hoffmann, 2006). Daun tunggal berwarna hijau dengan permukaan daun bagian bawah berwarna lebih terang, tangkai pendek, bentuk bulat telur atau bulat panjang, panjang 9-25 cm, tepi agak bergelombang, bagian ujung meruncing, dan pangkal tumpul. Pada saat muda, daun berwarna hijau muda dan menjadi hijau tua setelah tua. Buah bulat kecil-kecil dengan diameter sekitar 1 cm, keluar dari ketiak daun atau di ujung percabangan. Sebelum matang berwarna hijau rasanya asam, jika telah matang menjadi ungu kehitaman dan rasanya manis sedikit asam (LIPI, 2009).

#### 2.4.3 Penyebaran dan budidaya

*Antidesma bunius* L. merupakan suatu jenis tanaman dari famili Euphorbiaceae yang tersebar luas mulai dari Srilanka, India Selatan, Himalaya

**Universitas Indonesia**

Timur, Myanmar, Indo Cina, Cina Selatan, Thailand, Malaysia (Pulau Banggi), dan Australia (Queensland). Dibudidayakan secara luas di Indonesia (terutama di Jawa), Malaysia dan Filipina (Sosef, Hong, & Prawirohatmodjo, 1998).

#### 2.4.4 Kandungan Kimia

Ekstrak etanol 80% daun *antidesma bunius* mengandung senyawa golongan glikosida, tannin, saponin, sterol-terpen, dan antrakuinon. Sedangkan, ekstrak etanol 80% korteks *antidesma bunius* mengandung alkaloid, tannin, saponin, dan sterol-terpen (Elya, Basah, Mun'im, Yuliatuti, Bangun, & Septiana, 2012).

#### 2.4.5 Manfaat

*Antidesma bunius* (L.) Spreng yang dikenal sebagai tanaman buni, banyak digunakan masyarakat sebagai obat tradisional untuk mengobati darah tinggi, jantung berdebar, kurang darah, sifilis (Puspitasari & Ulfa, 2009) dan kanker (Micor, Deocar, & Mojica, 2005). Buah biasanya digunakan untuk sirup, selai dan jeli ataupun difermentasi menjadi wine (Butkhup & Samappito, 2008). Daunnya dapat digunakan untuk mengobati gigitan ular (Orwa et al, 2009).

### 2.5 Simplisia, Ekstrak, dan Ekstraksi

#### 2.5.1 Simplisia

Simplisia merupakan bahan alami yang biasanya digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan (DepKes RI, 1979). Simplisia terbagi menjadi tiga macam, yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan, atau eksudat tumbuhan (DepKes RI, 1979).

#### 2.5.2 Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dari simplisia nabati atau simplisia hewani dengan cara ekstraksi senyawa aktif menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau

**Universitas Indonesia**

serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (DepKes RI, 1995a). Ekstrak cair adalah sediaan simplisia nabati yang mengandung etanol sebagai pelarut atau sebagai pengawet (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

### 2.5.3 Ekstraksi dan Metode Ekstraksi

#### 2.5.3.1 Proses pembuatan ekstrak

(Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

##### a. Pembuatan serbuk simplisia

Proses awal pembuatan ekstrak adalah tahapan pembuatan serbuk simplisia kering sampai derajat kehalusan tertentu.

##### b. Cairan pelarut

Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat dipisahkan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Cairan pelarut dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang diperbolehkan adalah air dan etanol serta campurannya. Jenis pelarut lainnya seperti metanol, heksana, toluene, kloroform, dan aseton umumnya digunakan sebagai pelarut untuk tahap pemisahan dan tahap pemurnian (fraksinasi).

##### c. Pemisahan dan pemurnian

Tahap ini bertujuan untuk memisahkan senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni. Proses-proses pada tahapan ini adalah pengendapan, pemisahan dua cairan tak campur, sentrifugasi, dekantasi, filtrasi serta proses adsorbs dan penukar ion.

#### d. Pemekatan/penguapan (evaporasi)

Pemekatan berarti peningkatan jumlah partial solute (senyawa terlarut) secara penguapan pelarut sampai ekstrak menjadi kental/pekat.

#### e. Rendemen

Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal.

### 2.5.3.2 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah penarikan kandungan kimia menggunakan pelarut cair untuk memisahkan senyawa yang larut dengan senyawa yang tidak larut. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut menjadi 2 cara, yaitu cara dingin dan cara panas. Ekstraksi cara dingin antara lain :

#### a. Maserasi

Pada cara maserasi, simplisia diekstraksi menggunakan pelarut dengan pengadukan yang terus-menerus pada temperatur ruangan (kamar). Lalu dilakukan penyaringan, dan remaserasi, yaitu pengulangan penambahan pelarut setelah penyaringan maserat pertama, dan seterusnya. (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

#### b. Perkolasi

Pada cara perkolasi, ekstraksi dilakukan pada suhu kamar menggunakan pelarut yang selalu baru sampai sempurna. Proses ini terdiri dari tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan atau penampungan ekstrak), terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

Pada ekstraksi cara panas, ekstraksi dilakukan dengan suhu yang lebih tinggi daripada suhu kamar. Ekstraksi cara panas antara lain:

#### a. Refluks

Pada cara refluks, ekstraksi dilakukan pada temperatur titik didih pelarut selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya proses dilakukan berulang kali pada residu

pertama sampai 3-5 kali (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000)

b. Soxhlet

Soxhlet dilakukan dengan alat khusus menggunakan pelarut yang selalu baru sehingga ekstraksi terjadi secara terus-menerus dengan jumlah pelarut yang konstan dan adanya pendingin balik. (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

c. Digesti

Digesti dilakukan dengan pengadukan kontinu pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), umumnya dilakukan pada temperatur 40-50<sup>0</sup>C (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

d. Infus

Pada cara infus, ekstraksi menggunakan pelarut air pada temperatur penangas air, dimana bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih (temperatur 96-98<sup>0</sup>C) selama waktu tertentu (15-20 menit) (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

e. Dekok

Dekok adalah ekstraksi cara infus pada waktu yang lebih lama ( $\geq 30$  menit) dan temperatur sampai titik didih air (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

## 2.6 Enzim

Enzim adalah protein katalisator yang meningkatkan laju raksi kimia setidaknya 10<sup>6</sup> kali dibandingkan jika tidak dikatalisis dan tidak ikut bereaksi serta tidak mengalami perubahan selama berlangsungnya reaksi tersebut. Enzim bersifat spesifik untuk tipe reaksi yang dikatalisis maupun substrat, atau substrat-substrat yang berhubungan erat (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).

Molekul enzim memiliki kantung khusus yang disebut sebagai sisi aktif. Sisi aktif tersebut mengandung rantai samping asam amino yang membentuk permukaan tiga dimensi yang bersifat komplementer pada substrat. Pengikatan substrat pada sisi aktif membentuk kompleks enzim-substrat (ES) yang selanjutnya dikonversi menjadi enzim-produk (EP) yang terpisah (Champe, Harvey, & Ferrier, 2010).



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

### 2.6.1 Faktor-faktor yang mempengaruhi laju reaksi enzim

#### a. Suhu

Peningkatan suhu akan meningkatkan laju reaksi karena meningkatnya energi kinetik dan frekuensi tumbukan molekul-molekul yang bereaksi. Namun, peningkatan suhu yang terlalu tinggi dapat menurunkan laju reaksi yang disebabkan denaturasi enzim (Champe, Harvey, & Ferrier, 2010).

#### b. Konsentrasi substrat

Laju reaksi ( $v$ ) adalah jumlah molekul substrat yang dikonversi menjadi produk per satuan waktu. Laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat hingga dicapai kecepatan maksimum ( $V_{maks}$ ). Pada konsentrasi substrat yang tinggi, menyebabkan saturasi enzim terhadap substrat karena seluruh sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat (Champe, Harvey, & Ferrier, 2010).

#### c. pH

Hubungan aktivitas dengan konsentrasi ion hidrogen memperlihatkan keseimbangan antara denaturasi enzim pada pH tinggi atau rendah dan efek pada keadaan bermuatan dari enzim, substrat, atau keduanya (Murray, Granner, & Rodwell, 2009). Pada kondisi pH yang ekstrim, dapat terjadi denaturasi enzim karena struktur dari sisi aktif molekul protein bergantung pada karakter ionik rantai samping asam amino (Champe, Harvey, & Ferrier, 2010).

### 2.6.2 Kinetika Penghambatan Enzim

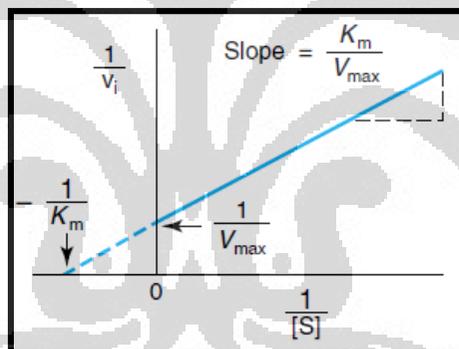
Kinetika penghambatan aktivitas enzim diukur dengan meningkatkan konsentrasi substrat, baik dengan maupun tanpa adanya inhibitor pada beberapa

konsentrasi yang berbeda. Selanjutnya dilakukan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten (Hartati, Elya, & Najib, 2010). 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 diatas adalah persamaan dalam suatu garis lurus,  $y = ax + b$ , di mana  $y = 1/v_i$  dan  $x = 1/[S]$ .  $1/v_i$  sebagai fungsi  $y$  (absorbansi sampel) sebidang dengan  $1/[S]$  sebagai fungsi dari  $x$  (jumlah substrat) sehingga memberikan garis lurus yang memotong sumbu  $y$  adalah  $1/V_{\max}$  dan dengan kemiringan  $K_m/V_{\max}$ . Plot tersebut disebut plot Lineweaver-Burk (Gambar 2.4).



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

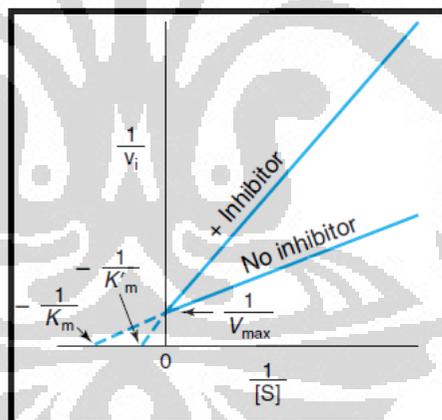
**Gambar 2.4** Plot Lineweaver-Burk

Plot Lineweaver-Burk digunakan untuk mengetahui nilai  $K_m$  dan  $V_{\max}$  yang dapat digunakan untuk membedakan antara inhibisi kompetitif dan non kompetitif berdasarkan pada menghilang atau tidak menghilangnya inhibisi pada saat konsentrasi substrat ditingkatkan. Kinetika inhibisi enzim ditentukan dengan meningkatnya konsentrasi substrat baik ada atau tidak adanya inhibitor.

### a. Inhibisi kompetitif

Suatu inhibitor kompetitif berlomba dengan substrat untuk berikatan dengan sisi aktif enzim, tetapi, sekali terikat tidak dapat diubah oleh enzim tersebut. Ciri penghambat kompetitif adalah penghambatan ini bersifat reversibel atau dapat diatasi hanya dengan meningkatkan konsentrasi substrat. Penghambat kompetitif biasanya menyerupai substrat normal atau biasa disebut analog substrat. Inhibitor kompetitif [I] hanya berikatan secara reversibel dengan enzim membentuk suatu kompleks EI. Namun, inhibitor [I] tidak dapat dikatalisa oleh enzim untuk menghasilkan produk reaksi yang baru (Lehninger, 1988).

Pada plot Lineweaver-Burk, inhibisi kompetitif memperlihatkan adanya perpotongan pada sumbu y pada  $1/V_{\max}$  ( $V_{\max}$  tidak berubah) dengan penghambat dan tanpa penghambat. Pola ini menunjukkan bahwa pada saat  $1/[S] = 0$ ,  $v_i$  akan sama seperti pada keadaan tanpa penghambat. Sedangkan, pada sumbu x, keadaan dengan penghambat atau tanpa penghambat terdapat pada intersep yang berbeda. Hal tersebut menandakan adanya peningkatan nilai  $K_m$  dengan adanya penghambat kompetitif.



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

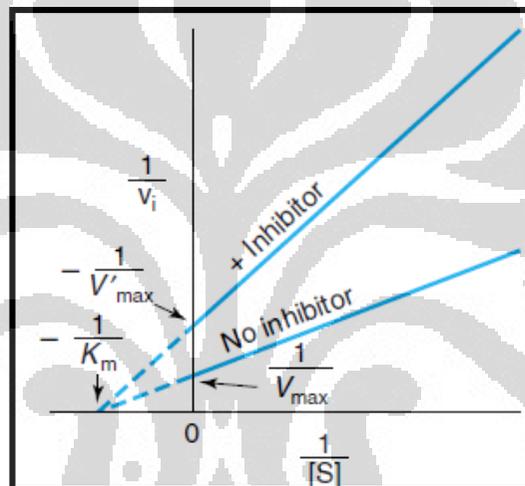
**Gambar 2.5** Plot Lineweaver-Burk dari Inhibisi Kompetitif

### b. Inhibisi non kompetitif

Pada penghambatan non kompetitif, inhibitor berikatan pada sisi enzim selain sisi aktif tempat berikatan, mengubah konformasi molekul enzim, sehingga mengakibatkan inaktivasi reversibel sisi katalitik. Inhibitor non kompetitif dapat berikatan secara reversibel pada molekul enzim bebas membentuk kompleks EI

**Universitas Indonesia**

(Enzim-Inhibitor) ataupun berikatan secara reversibel dengan kompleks ES (Enzim-Substrat) membentuk kompleks ESI (Enzim-Inhibitor-Substrat) (Lehninger, 1988). 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. Pada inhibisi non kompetitif, plot Lineweaver-Burk menunjukkan penurunan  $V_{\max}$  dengan adanya penghambat non kompetitif, sedangkan nilai  $K_m$  tetap.

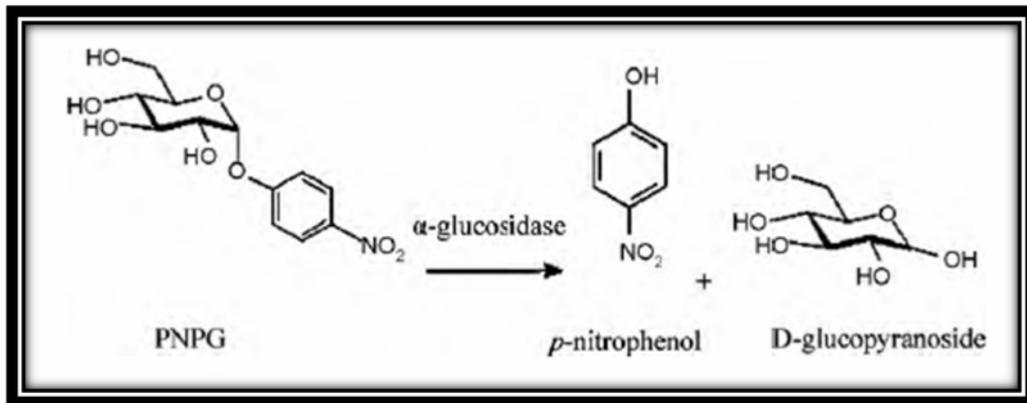


[Sumber : Murray, Granner, & Rodwell, 2009]

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

## 2.7 Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -glukosidase

Pengujian penghambatan aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase dilakukan dengan reaksi enzimatik menggunakan p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNGP) sebagai substrat. Pada uji ini, enzim  $\alpha$ -glukosidase menghidrolisis p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNGP) menjadi D-glukopiranosida dan p-nitrofenol yang berwarna kuning. Mekanisme reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 2.7.



[Sumber : Guo, Jiang, Lv, & Wang, 2010 ]

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

Intensitas warna kuning yang terbentuk dari *p*-nitrofenol ditentukan absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm (Hartati, Elya, & Najib, 2010). Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan absorbansi *p*-nitrofenol yang terbentuk. Semakin tinggi kemampuan ekstrak tanaman menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase, maka akan semakin berkurang *p*-nitrofenol yang terbentuk.

## 2.8 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri serap adalah pengukuran interaksi antara radiasi elektromagnetik panjang gelombang tertentu yang sempit dan mendekati monokromatik, dengan molekul atau atom dari suatu zat kimia. Hal ini didasarkan pada kenyataan bahwa molekul selalu mengabsorpsi cahaya elektromagnetik jika frekuensi cahaya tersebut sama dengan frekuensi getaran dari molekul tersebut. Elektron yang terikat dan elektron yang tidak terikat akan tereksitasi pada suatu daerah frekuensi, yang sesuai dengan cahaya ultraviolet dan cahaya tampak (Henry, MT Suryadi, & Yanuar, 2002).

Pengukuran serapan dapat dilakukan pada daerah ultraviolet meliputi (panjang gelombang 190nm sampai 380nm). Sedangkan, daerah cahaya tampak meliputi daerah panjang gelombang 380nm samapai 780nm (DepKes RI, 1979).

Spektrofotometer UV-Vis dapat digunakan baik untuk informasi kualitatif maupun analisa kuantitatif. Pada aspek kuantitatif, suatu berkas radiasi dikenakan pada larutan sampel dan intensitas sinar radiasi yang diteruskan diukur besarnya

(Gandjar & Rohma, 2007). Perhitungan secara kuantitatif didasarkan pada Hukum Lambert-Beers yang menyatakan hubungan empirik antara intensitas cahaya yang ditransmisikan dengan tebalnya larutan (Hukum Lambert), dan hubungan antara intensitas tadi dengan konsentrasi zat (Hukum Beers).

Hukum Lambert-Beers :

$$A = \log I_0/I_t = \epsilon \cdot b \cdot c = a \cdot b \cdot c \quad (2.3)$$

Keterangan :

A = serapan

$I_0$  = intensitas sinar datang

$I_t$  = intensitas sinar yang ditransmisikan

$\epsilon$  = absorbtivitas molekuler/konstanta ekstingsi (L/mol.cm)

a = daya serap (L/g.cm)

b = tebal larutan/kuvet (cm)

c = konsentrasi (g/L ; mg/mL)

Panjang gelombang yang digunakan untuk melakukan analisa kuantitatif suatu zat biasanya merupakan panjang gelombang dimana zat memberikan serapan yang maksimum ( $\lambda_{maks}$ ), karena keakuratan pengukurannya akan lebih besar. Hal tersebut dapat terjadi karena pada panjang gelombang maksimum bentuk serapan pada umumnya landai sehingga perubahan yang tidak terlalu besar pada kurva serapan tidak akan menyebabkan kesalahan pembacaan yang terlalu besar pula. Serapan yang optimum untuk pengukuran menggunakan spektrofotometri Uv-Vis ini berkisar antara 0,2-0,8 (Henry, MT Suryadi, & Yanuar, 2002).

## 2.9 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah suatu cara pemisahan zat berkhasiat dan zat lain yang ada dalam sediaan, dengan cara penyarian berfraksi, penyerapan, atau penukaran ion pada zat berpori, menggunakan cairan atau gas yang mengalir. Zat yang diperoleh dapat digunakan untuk percobaan identifikasi atau penetapan kadar. Kromatografi yang sering digunakan adalah kromatografi kolom, kromatografi kertas, kromatografi lapisan tipis, dan kromatografi gas (DepKes RI, 1979).

Universitas Indonesia

Kromatografi lapisan tipis (KLT) digunakan pada pemisahan zat secara cepat, dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca. Lempeng yang dilapis dapat dianggap sebagai kolom kromatografi terbuka dan pemisahan didasarkan pada penyerapan, pembagian atau gabungannya, tergantung dari jenis zat penyerap dan cara pembuatan lapisan zat penyerap dan jenis pelarut. Adapun beberapa contoh zat penyerap yang digunakan untuk pemisahan dalam kromatografi lapisan tipis dapat dilihat pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.1** Beberapa zat penyerap yang biasa digunakan untuk Kromatografi Lapisan Tipis

No.	Penyerap	Penggunaan
1.	Silika gel	Steroid, asam amino, alkohol, hidrokarbon, alkaloid, asam lemak, lipid, vitamin.
2.	Alumina oksida	Alkaloid, alkohol, lipid, steroid, vitamin, amina, aflatoksin.
3.	Kieselguhr	Gula, karbohidrat, asam lemak, , asam amino, alkohol, asam karboksilat
4.	Bubukselulosa	Asam amino, karbohidrat, nukleotida.
5.	Sephadex	Polimer, protein, kompleks logam.

[Sumber : Touchstone & Dobbins, 1983 & Gandjar & Rohma, 2007]

Metode kromatografi lapisan tipis merupakan teknik yang populer digunakan karena memiliki beberapa kelebihan, yaitu penggunaannya mudah, menghasilkan pemisahan yang lebih baik, sensitivitas tinggi, hanya membutuhkan waktu yang singkat, dan harganya terjangkau (Touchstone & Dobbins, 1983).

Pada kromatografi lapis tipis, harga  $R_f$  adalah cara yang sesuai untuk menunjukkan posisi zat dalam pengembang kromatogram. Harga  $R_f$  tersebut dapat dihitung dengan perbandingan sebagai berikut :

$$R_f = \frac{\text{Jarak perambatan zat dari titik penotolan}}{\text{Jarak perambatan fase gerak dari titik penotolan}}$$

**Universitas Indonesia**

Harga Rf yang diperoleh pada kromatografi lapisan tipis tidak tetap jika dibandingkan dengan yang diperoleh pada kromatografi kertas. Oleh karena itu pada lempeng yang sama disamping kromatogram dari zat yang diperiksa perlu dibuat kromatogram dari zat pembanding kimia, lebih baik dengan kadar yang berbeda-beda. Perkiraan identifikasi diperoleh dengan pengamatan 2 bercak dengan harga Rf dan ukuran yang lebih kurang sama (DepKes RI, 1995b).

## **2.10 Kromatografi kolom** (Saker, Latif, & Gray, 2006)

Kromatografi kolom adalah tehnik pemisahan yang biasanya digunakan untuk tujuan preparatif dengan skala mikrogram sampai kilogram. Prinsip dari kromatografi kolom konvensional adalah partisi dan adsorpsi secara selektif, dimana komponen kimia akan bergerak berdasarkan pengaruh gaya gravitasi mengikuti eluen karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama. Oleh karena terdapat perbedaan kelarutan tiap-tiap komponen kimia dalam eluen, maka akan terjadi pemisahan berdasarkan tingkat kepolaran. Sistem elusi pada kolom dapat menggunakan gravitasi, tekanan, vakum, dan pompa.

### 2.10.1 Sistem Gravitasi

Secara umum, hasil yang baik dapat dicapai dengan elusi menggunakan gravitasi. Elusi secara gravitasi dilakukan dengan menuangkan fase gerak di atas kolom yang terbuka dan fase gerak tersebut akan mengalir ke bawah berdasarkan gaya gravitasi. Kecepatan alir dapat dikontrol dengan mengatur klem buret.

### 2.10.2 Sistem Tekanan

Elusi dengan tekanan dapat dilakukan untuk mempercepat laju alir dan tercapainya pemisahan yang baik.

### 2.10.3 Sistem Vakum

Pada kondisi ini, sistem dirancang untuk bekerja pada kondisi vakum terus-menerus. Kolom kromatografi dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Vakum dihentikan, pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penjerap lalu divakumkan lagi. Cuplikan dimasukkan dalam pelarut yang cocok, dimasukkan langsung pada

**Universitas Indonesia**

bagian atas kolom dan dihisap perlahan-lahan ke dalam kemasan dengan memvakumkannya. Kolom dielusui dengan campuran pelarut yang cocok, mulai dengan pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan, kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi. Kromatografi cair vakum menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju aliran fase gerak.

#### 2.10.4 Sistem Pompa

Sistem aliran dari pelarut akan lebih terkontrol dengan menggunakan sistem pompa karena cara ini dapat mengalirkan pelarut secara lancar dan konstan.

### 2.11 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi Aktif

Pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan. Pemeriksaan lebih kepada senyawa metabolit sekunder yang bermanfaat untuk kesehatan seperti, alkaloid, flavonoid, terpen, tanin, saponin, glikosida, kuinon dan antrakuinon (Harborne, 1987).

#### 2.11.1 Alkaloid

Alkaloid adalah golongan senyawa yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen yang seringkali terdapat dalam cincin heterosiklik. Senyawa ini biasanya terdapat dalam tumbuhan sebagai garam berbagai asam organik (Robinson, 1995). Sebagian besar alkaloid berbentuk kristal padat dan sebagian kecil berupa cairan pada suhu kamar, dan rasanya pahit. Alkaloid dapat dideteksi dengan cara pengendapan menggunakan pereaksi Mayer, Dragendorf, dan Bouchardat (Harborne, 1987).

#### 2.11.2 Flavonoid

Flavonoid sering terdapat pada seluruh dunia tumbuhan berpembuluh sebagai glikosida. Terdapat lebih dari 4000 flavonoid dalam bentuk glikosida dan hampir 500 flavonoid dalam bentuk aglikon (Robinson, 1995). Dalam

**Universitas Indonesia**

menganalisis flavonoid, umumnya yang diperiksa adalah aglikon dalam ekstrak tumbuhan yang sudah dihidrolisis. Proses ekstraksi flavonoid dilakukan menggunakan etanol mendidih untuk menghindari oksidasi enzim (Harborne, 1987). Senyawa ini dapat diidentifikasi dengan menambahkan larutan besi (III) klorida 1% dalam air atau etanol yang akan menimbulkan warna hijau atau hitam kuat.

### 2.11.3 Terpen

Terpen adalah senyawa yang berasal dari molekul isopren  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$  dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan unit isopren tersebut. Terdapat beberapa macam senyawa terpenoid seperti monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap, diterpen yang sukar menguap dan yang tidak menguap, triterpen, dan sterol.

Umumnya terpen berada di dalam sitoplasma sel tumbuhan dan dapat diekstraksi menggunakan eter dan kloroform karena larut dalam lemak (Harborne, 1987). Terpen biasanya diidentifikasi menggunakan reaksi Liebermann-Bouchardat (anhidrat asetat- $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) yang memberikan warna hijau kehitaman sampai biru.

### 2.11.4 Tanin

Tanin merupakan senyawa yang memiliki gugus fenol. Umumnya tannin terdapat pada tumbuhan berpembuluh dan rasanya sepat. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tak larut dalam air dan sering digunakan untuk menyamak kulit karena kemampuannya menyambung-silang protein (Harborne, 1987).

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

### 2.11.5 Saponin

Saponin adalah glikosida triterpen yang dapat menimbulkan busa jika dikocok dengan air. Oleh karena itu, saponin dapat diidentifikasi dengan cara sederhana, yaitu 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 selama beberapa waktu. Pada konsentrasi yang rendah dapat menyebabkan hemolisis sel darah merah pada tikus (Harborne, 1987).

### 2.11.6 Glikosida

Glikosida adalah senyawa yang jika dihidrolisis dapat terurai menjadi gula (glikon) dan senyawa lain (aglikon atau genin). Umumnya glikon berupa glukosa, fruktosa, laktosa, galaktosa dan manosa. Sedangkan aglikon (genin) biasanya mempunyai gugus -OH dalam bentuk alkoholis atau fenolis. Glikosida dapat diidentifikasi dengan pereaksi Mollisch setelah dihidrolisis menjadi gula (glikon).

### 2.11.7 Kuinon dan Antrakuinon

Kuinon merupakan pigmen warna alam yang beragam dan memiliki kromofor. Warna senyawa kuinon biasanya mulai dari kuning pucat sampai hampir hitam, dan struktur yang telah dikenal jumlahnya lebih dari 450. Kuinon dibagi menjadi empat kelompok, diantaranya adalah benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon dan isoprenoid. Pada identifikasi kelompok benzokuinon, naftokuinon dan antrakuinon diperlukan hidrolisis asam untuk melepas kuinon bebasnya (Harborne, 1987).

## **BAB 3 METODE PENELITIAN**

### **3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Laboratorium Penelitian Fitokimia, Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kualitatif, Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, dan Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok, selama kurang lebih empat bulan, dari bulan Januari hingga Mei 2012.

### **3.2 Alat**

Lemari pengering, ayakan, oven (Hotpack vacuum oven), timbangan analitik, blender (Philips), *rotary vacuum* evaporator (Buchi, IKA), pH meter (Eutech Instruments), vortex, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-1601), kuvet, pipet mikro, alkoholmeter, freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ , *shaker* inkubator, *vacuum pump*, lempeng silika gel GF<sub>254</sub>, kolom kromatografi, dan alat-alat gelas.

### **3.3 Bahan**

#### **3.3.1 Bahan Uji**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun buni (*Antidesma bunius* L.) yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense (LIPI), Bogor.

#### **3.3.2 Bahan Kimia**

Enzim  $\alpha$ -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, air suling, aqua demineralisata, 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 (Merck, Jerman), silika gel 60 H (Merck, Jerman).

### 3.3.3 Penyiapan Larutan Uji

#### 3.3.3.1 Penyiapan Larutan Ekstraksi dan Pereaksi Identifikasi Golongan Senyawa Kimia

##### a. Etanol 80%

Sebanyak 834 mL etanol 70% P yang telah didestilasi diencerkan dengan akuades sedikit demi sedikit, disertai pengecekan menggunakan alkoholmeter setiap kali penambahan akuades, hingga batas alkoholmeter menunjukkan angka 80.

##### b. Larutan Raksa (II) Klorida

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

##### c. Larutan Kalium Iodida

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

##### d. Larutan Pereaksi Mayer

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

##### e. Larutan Pereaksi Bouchardat

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

f. Larutan Asam Nitrat 0,5 N

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

g. Larutan Bismuth Nitrat

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

h. Larutan Kalium Iodida

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

i. Larutan Pereaksi Dragendorf

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

j. Larutan Pereaksi Mollisch

Larutan Pereaksi Mollisch dibuat dengan cara melarutkan 1,50 g  $\alpha$ -naftol P dalam 50 mL metanol.

k. Larutan HCl 2N

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

l. Larutan  $\text{FeCl}_3$  1%

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

m. Larutan NaOH 0,1 N

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

n. Kalium Dihidrogenfosfat 0,1 M

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

3.3.3.2 Penyiapan Larutan Uji Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -glukosidase

a. Larutan Dapar Fosfat pH 6,6

Larutan dapar fosfat pH 6,6 dibuat dengan mencampurkan 50,0 mL Kalium dihidrogenfosfat 0,1 M dengan sedikit demi sedikit (hingga kurang lebih 16,4 mL) natrium hidroksida 0,1 N, disertai pengecekan menggunakan pH meter setiap kali penambahan natrium hidroksida 0,1 N. Campuran tersebut kemudian ditambahkan dengan air bebas CO<sub>2</sub> secukupnya hingga 200,0 mL.

b. Larutan Dapar Fosfat pH 6,8

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

c. Larutan Dapar Fosfat pH 7,0

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

d. Larutan Dapar Fosfat pH 7,2

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

e. Larutan Bovin Serum Albumin (BSA)

Larutan Bovin Serum Albumin dibuat dengan melarutkan 200 mg BSA dengan dapar fosfat (pH 6,6/6,8/7,0/7,2) hingga 100 mL.

f. Larutan Enzim

Larutan enzim dibuat dengan melarutkan 10,1 mg enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan dapar fosfat (pH 6,8/7,0/7,2) yang mengandung gliserol 50% hingga 10,0 mL. Pembuatan larutan enzim dilakukan pada di dalam *ice box* suhu -2 hingga -8°C. Sebelum digunakan, larutan enzim tersebut diencerkan seperti yang tertera pada Lampiran 1 hingga 0,15 U/mL (Sigma-Aldrich, 1996) dengan menggunakan dapar fosfat yang mengandung *bovine serum albumin* (BSA). Larutan induk enzim disimpan dalam bentuk aliquot di dalam freezer -20 °C agar tetap stabil selama beberapa bulan. Sedangkan, larutan enzim 0,15 U/mL disimpan di dalam kulkas -2 sampai 8°C agar tetap stabil selama beberapa minggu.

g. Larutan Substrat p-Nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG)

Larutan substrat dibuat dengan melarutkan 60,3 mg p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida dan dicukupkan volumenya dengan aqua demineralisata hingga 10,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi 20 mM. Larutan substrat 20 mM diencerkan hingga didapatkan larutan substrat 15; 10; 5; 2,5; 1,25; dan 0,625 mM.

h. Larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 mM

Larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  200 mM dengan melarutkan 21,2 g natrium karbonat dengan akuades hingga 1000,0 mL.

i. Larutan Akarbose

Akarbose ditimbang sebanyak 200 mg dan dilarutkan dalam dapar fosfat pH 6,8 hingga diperoleh konsentrasi larutan standar 2%. Larutan induk 2% diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar 1; 0,5; 0,25; 0,125 dan 0,0625%.

j. Larutan Kuersetin

Kuersetin ditimbang sebanyak 100 mg dan dicukupkan volumenya dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga 100,0 mL dan diperoleh konsentrasi larutan induk 3,33 ppm. Larutan induk 3,33 ppm diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar 2,5; 2,22; 1,67; 0,83 dan 0,42 ppm.

k. Larutan Sampel

Ekstrak ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dengan dimetil sulfoksida kemudian dicukupkan volumenya hingga 10,0 mL dengan dapar fosfat pH 6,8 ke dalam labu ukur hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 1%. Larutan ekstrak 1% diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,01563%.

### 3.4 Prosedur Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa langkah berikut (Lampiran 2) :

- a. Penyiapan simplisia
- b. Ekstraksi simplisia
- c. Fraksinasi partisi cair-cair
- d. Uji pendahuluan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase
- e. Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dari berbagai fraksi
- f. Pemisahan menggunakan kromatografi kolom dengan bantuan vakum
- g. Penggabungan fraksi kolom dengan kromatografi lapis tipis
- h. Uji aktivitas fraksi gabungan dari kromatografi kolom

Universitas Indonesia

- i. Uji kinetika penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase dari fraksi teraktif
- j. Identifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi teraktif

#### 3.4.1 Penyiapan Simplisia

Daun buni yang berwarna hijau tua dan segar dikumpulkan. Lalu disortasi, dibersihkan dari pengotor dengan cara dilap menggunakan lap kering. Selanjutnya, daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan terlindung dari sinar matahari langsung, kemudian dilanjutkan ke dalam lemari pengering suhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$  dan ditimbang berat daun kering. Selanjutnya, dilakukan sortasi kembali pada simplisia kering untuk memisahkan benda-benda asing maupun pengotor yang masih tertinggal, kemudian simplisia kering tersebut diblender hingga menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan 40 mesh.

#### 3.4.2 Ekstraksi

Simplisia kering sebanyak 593,7 g diekstraksi menggunakan pelarut etanol 80% dengan cara direfluks selama 1 jam, kemudian disaring. Ampasnya di refluks kembali hingga tiga kali dan filtratnya dikumpulkan. Lalu, ekstrak tersebut diuapkan pelarutnya menggunakan rotary evaporator pada suhu  $40\text{-}50^{\circ}\text{C}$  hingga menjadi ekstrak kental dan ditimbang beratnya.

#### 3.4.3 Fraksinasi Partisi Cair-cair

Fraksinasi ekstrak kental etanol dilakukan secara partisi cair-cair menggunakan corong pisah dengan pelarut yang semakin meningkat kepolarannya, yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol. Sebelum difraksinasi, ekstrak kental etanol didispersikan dengan 200 mL air hangat ( $\pm 40^{\circ}\text{C}$ ) terlebih dahulu, lalu ditambahkan 200 mL n-heksana (Kim, Nam, Kurihara, & Kim, 2008), dikocok selama  $\pm 1$  jam, didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan, dipisahkan kedua lapisan (lapisan bawah adalah air dan lapisan atas adalah n-heksana). Ekstrak n-heksana yang diperoleh diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga didapatkan ekstrak kental n-heksana, sedangkan ekstrak air difraksinasi kembali dengan cara yang sama menggunakan pelarut etil asetat hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat dan ekstrak air.

Lapisan air dikeringkan menggunakan *freeze drier*, kemudian dilarutkan dengan metanol, dan pelarut diuapkan dengan bantuan *oven vacuum* hingga diperoleh ekstrak kental metanol (Lampiran 3) Kemudian ditimbang fraksi n-heksana, etil asetat, dan metanol yang diperoleh.

#### 3.4.4 Uji Pendahuluan Aktivitas $\alpha$ -glukosidase

Sebelum uji penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase, terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan aktivitas  $\alpha$ -gluksidase yang terdiri dari penentuan panjang gelombang p-nitrofenol dan optimasi aktivitas enzim  $\alpha$ -gluksidase untuk mengetahui kondisi yang optimal agar enzim bekerja secara optimal. Optimasi aktivitas enzim meliputi optimasi konsentrasi substrat, dan optimasi pH. Setelah didapatkan kondisi yang optimum, uji aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dilakukan berdasarkan kondisi tersebut.

##### 3.4.4.1 Penentuan Panjang Gelombang p-nitrofenol

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 5  $\mu$ L dimetil sulfoksida (DMSO), 245  $\mu$ L 100 mM dapar fosfat pH 6,8 (Sigma-Aldrich) dan 125  $\mu$ L 10 mM p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG), lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya, ditambahkan 125  $\mu$ L larutan enzim 0,15 U/mL (Sigma-Aldrich) dan selanjutnya diinkubasi selama 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 1000  $\mu$ L 200 mM Natrium karbonat.

**Tabel 3.1.** Prosedur Penentuan panjang gelombang

Reagen	Volume ( $\mu\text{L}$ )
	Uji
DMSO	5
Dapar fosfat pH 6,8	245
Substrat (10 mM)	125
<b>Diinkubasi dengan inkubator 37°C, 5 menit</b>	
Enzim (0,15 U/mL)	125
Natrium karbonat 200 Mm	-
<b>Diinkubasi dengan inkubator 37°C, 15 menit</b>	
Enzim (0,15 U/mL)	-
Natrium karbonat 200 mM	1000
Volume total	1500
<b>Diukur absorbansi pada <math>\lambda</math> maksimum = 400 nm (Sigma-Aldrich)</b>	

#### 3.4.4.2 Penentuan Konsentrasi Optimum Substrat

Larutan 5  $\mu\text{L}$  DMSO dan dapar fosfat pH 6,8 sebanyak 245  $\mu\text{L}$  dicampur. Lalu ditambahkan 125  $\mu\text{L}$  substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dari masing-masing konsentrasi yang telah dibuat dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam sampel ditambahkan 125  $\mu\text{L}$  enzim  $\alpha$ -glukosidase 0,15 U/mL dalam dapar fosfat pH 6,8. Campuran diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 1000  $\mu\text{L}$  Natrium karbonat 200 mM. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

**Tabel 3.2.** Prosedur Optimasi Konsentrasi Substrat

Reagen	Volume ( $\mu\text{L}$ )	
	Uji	Kontrol
DMSO	5	5
Dapar fosfat (pH 6,8)	245	245
Substrat (konsentrasi 30/20/ 15 / 10 / 5 / 2,5 / 2 / 1 mM)	125	125
<b>Diinkubasi dengan inkubator 37°C, 5 menit</b>		
Enzim (0,15 U/mL)	125	-
Natrium karbonat 200 mM	-	1000
<b>Diinkubasi dengan inkubator 37°C, 15 menit</b>		
Enzim (0,15 U/mL)	-	125
Natrium karbonat 200 mM	1000	-
<b>Volume total</b>	1500	1500
<b>Diukur absorbansi pada <math>\lambda = 400 \text{ nm}</math></b>		

Keterangan: U= larutan uji ,K= larutan kontrol.

#### 3.4.4.3 Penentuan pH Optimum

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 5  $\mu\text{L}$  dimetil sulfoksida (DMSO), 245  $\mu\text{L}$  100 mM dapar fosfat (pH 6,6; 6,8; 7,0) dan 125  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) konsentrasi 5 mM, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam sampel ditambahkan 125  $\mu\text{L}$  enzim  $\alpha$ -glukosidase 0,15 U/mL dalam dapar fosfat berbagai pH (6,6; 6,8; 7,0). Campuran diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 1000  $\mu\text{L}$  Natrium karbonat 200 mM. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

**Tabel 3.3.** Prosedur Optimasi pH

Universitas Indonesia

Reagen	Volume ( $\mu\text{L}$ )					
	U <sub>1</sub> (pH 6,6)	K <sub>1</sub> (pH 6,6)	U <sub>1</sub> (pH 6,8)	K <sub>1</sub> (pH 6,8)	U <sub>2</sub> (pH 7,0)	K <sub>2</sub> (pH 7,0)
DMSO	5	5	5	5	5	5
Dapar fosfat pH 6,6	245	245	-	-	-	-
Dapar fosfat pH 6,8	-	-	245	245	-	-
Dapar fosfat pH 7,0	-	-	-	-	245	245
Substrat (konsentrasi 5 mM)	125	125	125	125	125	125
<b>Diinkubasi dengan inkubator 37°C, 5 menit</b>						
Enzim (0,15 U/mL)	125	-	125	-	125	-
Natrium karbonat 200 mM	-	1000	-	1000	-	1000
<b>Diinkubasi dengan inkubator 37°C, 15 menit</b>						
Enzim (0,15 U/mL)	-	125	-	125	-	125
Natrium karbonat 200 mM	1000	-	1000	-	1000	-
<b>Diukur absorbansi pada <math>\lambda = 400 \text{ nm}</math></b>						

Keterangan: U = larutan uji, K = larutan kontrol

#### 3.4.4.4 Penentuan Suhu Optimum

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 5  $\mu\text{L}$  dimetil sulfoksida (DMSO), 245  $\mu\text{L}$  100 mM dapar fosfat pH 6,8 dan 125  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) konsentrasi 5 mM, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 30, 37, dan 40°C. Kedalam sampel ditambahkan 125  $\mu\text{L}$  enzim  $\alpha$ -glukosidase 0,15 U/mL dalam dapar fosfat pH 6,8. Campuran diinkubasi selama 15 menit pada suhu 30, 37, dan 40°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 1000  $\mu\text{L}$  Natrium karbonat 200 mM. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

**Tabel 3.4.** Prosedur Optimasi Suhu

Reagen	Volume ( $\mu\text{L}$ )	
	Uji	Kontrol
DMSO	5	5
Dapar fosfat (pH 6,8)	245	245
Substrat (konsentrasi 5 mM)	125	125
<b>Diinkubasi dengan inkubator 30/37/40°C, 5 menit</b>		
Enzim (0,15 U/mL)	125	-
Natrium karbonat 200 mM	-	1000
<b>Diinkubasi dengan inkubator 30/37/40°C, 15 menit</b>		
Enzim (0,15 U/mL)	-	125
Natrium karbonat 200 mM	1000	-
Volume total	1500	1500
<b>Diukur absorbansi pada <math>\lambda = 400 \text{ nm}</math></b>		

Keterangan: U = larutan uji, K = larutan kontrol.

#### 3.4.4.5 Perhitungan Aktivitas Enzim

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

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

[Sumber : Sigma-Aldrich, 1996]

Keterangan :

V = Volume total (mL)

df = faktor pengenceran

18.1 = Ekstinsi milimolar p-Nitrophenol pada 400 nm

$V_e$  = Volume enzim (mL)

t = Waktu inkubasi (menit)

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

Definisi Unit:

Satu unit melepaskan 1,0  $\mu\text{mol}$  D-glukosa dari p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukosida per menit pada pH 6,8 dan suhu 37°C.

### 3.4.5 Uji Penghambatan Aktivitas Enzim $\alpha$ -glukosidase (Elya, Basah, Mun'im, Yuliatuti, Bangun, & Septiana, 2012).

Setelah diperoleh kondisi optimasi, selanjutnya dilakukan uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase. Prosedur penentuan aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase adalah :

#### 3.4.5.1 Pengujian Blanko (B)

5  $\mu$ L larutan dimetil sulfoksida ditambah dengan 245  $\mu$ L dapar fosfat pH 6,8 dan 125  $\mu$ L p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi 5 mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam larutan ditambahkan 125  $\mu$ L larutan enzim 0,15 U/mL. Sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah inkubasi selesai, ditambahkan 1000  $\mu$ L 200 mM natrium karbonat. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

#### 3.4.5.2 Pengujian Kontrol (K)

5  $\mu$ L larutan dimetil sulfoksida ditambah dengan 245  $\mu$ L dapar fosfat pH 6,8 dan 125  $\mu$ L p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) konsentrasi 5 mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam larutan ditambahkan 1000  $\mu$ L 200 mM natrium karbonat. Sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 125  $\mu$ L larutan enzim 0,15 U/mL. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

#### 3.4.5.3 Pengujian Blanko Sampel (BS)

Larutan sampel (pembanding/ekstrak) 5  $\mu$ L dengan berbagai konsentrasi ditambahkan dengan 245  $\mu$ L dapar fosfat pH 6,8 dan 125  $\mu$ L p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi 5mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian, ditambahkan 125  $\mu$ L larutan enzim 0,15 U/mL. Inkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah selesai diinkubasi, ditambahkan 1000  $\mu$ L 200 mM natrium karbonat. Larutan diukur

absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

#### 3.4.5.4 Pengujian Kontrol Sampel (KS)

Sebanyak 5  $\mu\text{L}$  larutan sampel (pembanding/ekstrak) dengan berbagai konsentrasi ditambahkan dengan 245  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pH 6,8 dan 125  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi 5mM, diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian, ditambahkan 1000  $\mu\text{L}$  200 mM natrium karbonat dan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah selesai diinkubasi, ditambahkan 125  $\mu\text{L}$  larutan enzim. Absorbansi sampel diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

**Tabel 3.5** Prosedur Uji Aktivitas Penghambat  $\alpha$ -Glukosidase

Reagen	Volume ( $\mu\text{L}$ )			
	Blanko	Kontrol	Blanko Sampel (BS)	Kontrol Sampel (KS)
Sampel (pembanding/ ekstrak)	-	-	5	5
DMSO	5	5	-	-
Dapar fosfat pH 6,8	245	245	245	245
Substrat 5 mM	125	125	125	125
<b>Diinkubasi dengan inkubator 37°C, 5 menit</b>				
Enzim 0,15 U/mL	125	-	125	-
Natrium karbonat	-	1000	-	1000
<b>Diinkubasi dengan inkubator 37°C, 15 menit</b>				
Enzim 0,15 U/mL	-	125	-	125
Natrium karbonat	1000	-	1000	-
Volume total	1500	1500	1500	1500
<b>Diukur absorbansi pada <math>\lambda = 400 \text{ nm}</math></b>				

Keterangan: U = larutan uji, K = larutan kontrol.

Persentase penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dapat dihitung melalui rumus:

$$\% \text{ inhibisi} : [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\% \quad (3.3)$$

[Sumber : G.N, Kim., J.G, Shin., & H.D, Jang, 2009]

Keterangan:  $A_0$  = absorbansi blanko (DMSO)

$A_1$  = absorbansi sampel (pembanding/ekstrak)

Melalui persamaan regresi linear,  $y = a + bx$ , dimana sumbu x adalah konsentrasi sampel dan sumbu y adalah % inhibisi, maka nilai  $IC_{50}$  dapat dihitung menggunakan menggunakan rumus :

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

#### 3.4.6 Fraksinasi Menggunakan Kromatografi Kolom

Fraksi teraktif difraksinasi dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel. Silika gel tersebut dimasukkan ke dalam kolom, dipadatkan, lalu dialiri dengan eluen, dan di atasnya diberi kertas saring. Selanjutnya, fraksi teraktif yang telah dibuat menjadi serbuk dimasukkan ke dalam kolom dan dibiarkan terserap ke dalam fase diam dengan bantuan vakum. Teknik elusi yang digunakan adalah teknik elusi gradien menggunakan perbandingan pelarut etil asetat dan metanol. Kemudian hasilnya ditampung dalam vial-vial.

#### 3.4.7 Penggabungan Fraksi Kolom

Setelah diperoleh fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom, dilakukan kromatografi lapis tipis untuk dilihat profil kromatogramnya. Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan cara menotolkan sampel pada lempeng silika gel GF<sub>254</sub> dan dielusi menggunakan pelarut yang dapat memberikan pemisahan yang baik. Fraksi yang memiliki profil kromatogram yang sama digabungkan, lalu diuji aktivitasnya terhadap penghambatan  $\alpha$ -glukosidase. Fraksi gabungan yang memiliki aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase tertinggi diidentifikasi golongan senyawa kimianya.

#### 3.4.8 Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -glukosidase pada Fraksi dari Kromatografi Kolom

**Universitas Indonesia**

Fraksi gabungan teraktif hasil kromatografi kolom diuji aktivitas penghambatannya terhadap  $\alpha$ -glukosidase dengan prosedur seperti uji penghambatan aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase.

#### 3.4.9 Uji Kinetika Penghambatan Enzim

Pada uji kinetika penghambatan  $\alpha$ -glukosidase, ekstrak yang digunakan adalah fraksi hasil partisi cair-cair yang memiliki aktivitas penghambatan enzim paling tinggi. Pengukuran dilakukan dengan meningkatkan konsentrasi substrat konsentrasi p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida dengan ada maupun tanpa adanya ekstrak dengan berbagai konsentrasi substrat (Elya, Basah, Mun'im, Yuliatuti, Bangun, & Septiana, 2012).

Penentuan jenis penghambatan dilakukan dengan analisis data melalui plot Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten (Elya, Basah, Mun'im, Yuliatuti, Bangun, & Septiana, 2012) yang dihitung berdasarkan persamaan regresi  $y = a + b x$ ,  $1/[S]$  sebagai sumbu x dan  $1/v$  sebagai sumbu y (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).

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

Reagen	Volume ( $\mu$ L)	
	Tanpa Inhibitor	Dengan Inhibitor
Ekstrak	-	5
DMSO	5	-
Dapar pH 6,8	245	245
Substrat 5 Mm	125	125
<b>Diinkubasi dengan inkubator 37°C, 5 menit</b>		
Enzim(0,15 U/mL)	125	125
<b>Diinkubasi dengan inkubator 37°C, 15 menit</b>		
Natrium karbonat	1000	1000
Volume total	1500	1500
<b>Diukur absorbansi pada <math>\lambda = 400</math> nm</b>		

3.4.10 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi Teraktif (Depkes RI, 1995b; Farnsworth, 1966; Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984)

Fraksi teraktif hasil partisi cair-cair dan hasil kromatografi kolom diidentifikasi golongan senyawa kimianya dengan prosedur identifikasi golongan senyawa kimia menggunakan reaksi warna dan KLT. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan pembanding.

#### 3.4.10.1 Identifikasi Alkaloid

Fraksi metanol sebanyak 2 gram dilarutkan dengan 10 mL campuran air suling dan HCl 2 N (9:1), dipanaskan selama 2 menit. Selanjutnya disaring dan 1 mL filtrat digunakan sebagai larutan percobaan yang selanjutnya dilakukan sebagai berikut :

- a. Ditambahkan 2 tetes Bouchardat LP. Hasil positif dengan terbentuk endapan coklat sampai hitam.
- b. Ditambahkan 2 tetes Mayer LP. Hasil positif dengan terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning yang larut dalam metanol.
- c. Ditambahkan 2 tetes Dragendorf LP. Hasil positif terbentuk endapan jingga coklat.

Fraksi gabungan VI (etil asetat : metanol (60:140); (40:160); (20:180); (0:200)) dan pembanding (*Chinae cortex*) ditotolkan pada lempeng KLT silika gel GF<sub>254</sub> dan dielusi dengan menggunakan etil asetat-metanol-air (100:13,5:10). Lempeng dikeringkan dan disemprot dengan reagen Dragendorff. Hasil positif bila terbentuk warna jingga.

#### 3.4.10.2 Identifikasi Gugus Fenol

Fraksi gabungan VI (etil asetat : metanol (60:140); (40:160); (20:180); (0:200)) dan pembanding (*Theae folium*) ditotolkan pada lempeng KLT silika gel GF<sub>254</sub> dan dielusi dengan menggunakan butanol-asam asetat-air (40:10:50). Lempeng dikeringkan dan disemprot dengan FeCl<sub>3</sub>. Hasil positif bila terbentuk warna hitam.

#### 3.4.10.3 Identifikasi Flavonoid

Fraksi metanol sebanyak 3 gram ditambahkan 4 mL etanol 80% hingga ekstrak larut (larutan b). Selanjutnya dilakukan identifikasi flavonoid dengan langkah berikut :

- a. 2 mL larutan b ditambahkan 0,5 gram serbuk seng, kemudian ditambahkan 2 mL HCl 2N, didiamkan 1 menit. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat P. Dikocok perlahan, kemudian didiamkan 2-5 menit. Terbentuk warna merah intensif (positif flavonoid).
- b. 2 mL larutan b ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat P. Dikocok perlahan. Terbentuk warna merah jingga hingga merah ungu (positif flavonoid) atau kuning jingga (flavon, kalkon, auron).
- c. Ekstrak ditambahkan aseton, dilarutkan. Kemudian ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat dan asam oksalat, dipanaskan hati-hati dan hindari pemanasan berlebihan. Kemudian ditambahkan 10 mL eter. Diamati dengan sinar ultraviolet 366 nm. Larutan akan berfluoresensi kuning intensif (positif flavonoid).

Fraksi metanol dan fraksi gabungan VI (etil asetat : metanol (60:140); (40:160); (20:180); (0:200)) dan pembanding (*Orthosiphonis folium*) ditotolkan pada lempeng KLT silika gel GF<sub>254</sub> dan dielusi dengan menggunakan butanol-asam asetat-air (40:10:50). Lempeng dikeringkan dan disemprot dengan reagen AlCl<sub>3</sub>. Hasil positif bila terdapat fluoresensi kuning pada UV-366nm.

#### 3.4.10.4 Identifikasi Sterol/Terpen

Fraksi metanol sebanyak 2 gram ditambahkan dengan 5 mL larutan eter, diuapkan di dalam cawan penguap, lalu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat ke dalam residu, kemudian 1 tetes asam sulfat pekat. Filtrat mengandung sterol/terpen apabila terbentuk warna merah-hijau-violet-biru.

Fraksi gabungan VI (etil asetat : metanol (60:140); (40:160); (20:180); (0:200)) dan pembanding (*Caryophylli flos*) ditotolkan pada lempeng KLT silika gel GF<sub>254</sub> dan dielusi dengan menggunakan n-heksana-etil asetat (9:1). Lempeng dikeringkan, disemprot dengan vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dan dipanaskan. Hasil positif bila terbentuk warna violet-kebiruan.

#### 3.4.10.5 Identifikasi Tanin

Fraksi metanol dan kontrol positif *Theae folium* sebanyak 2 gram ditambahkan 15 mL air panas. Kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit. Disaring filtrat, lalu ditambahkan beberapa tetes gelatin membentuk endapan putih.

#### 3.4.10.6 Identifikasi Saponin

Fraksi metanol sebanyak 2 gram dan fraksi gabungan VI (etil asetat : metanol (60:140); (40:160); (20:180); (0:200)) sebanyak 20 mg masing-masing ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, kemudian didiamkan selama 10 menit. Terbentuk buih yang mantap setinggi 1 hingga 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang.

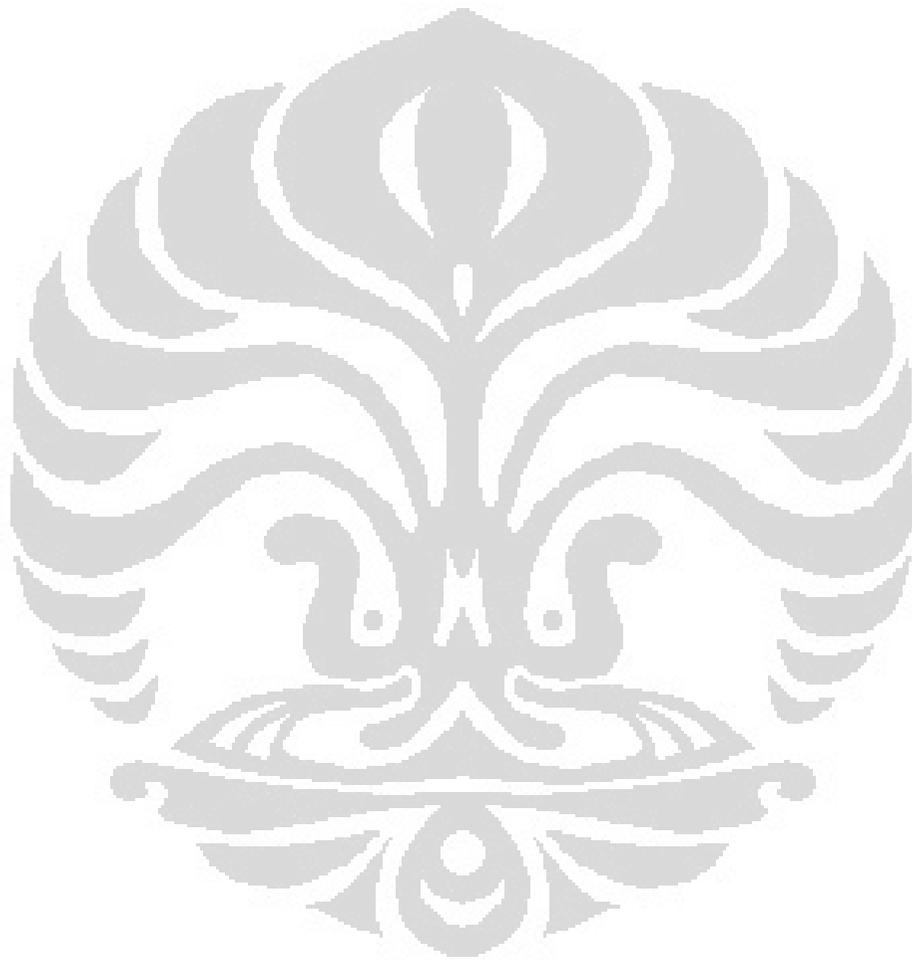
#### 3.4.10.7 Identifikasi Gula (DepKes RI, 1995b)

Fraksi metanol sebanyak 1 gram dan fraksi gabungan VI (etil asetat : metanol (60:140); (40:160); (20:180); (0:200)) sebanyak 30 mg ditambahkan 5 mL etanol 80%, lalu ditambahkan 5 tetes Mollisch LP. Kemudian ditambahkan dengan hati-hati 2 mL asam sulfat P. Hasil positif terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan (Reaksi Molisch). Pengujian juga dilakukan pada pembandingan yaitu *Nerii folium*.

#### 3.4.10.8 Identifikasi Kuinon dan Antrakuinon

Fraksi metanol sebanyak 2 gram ditambahkan 10 mL air panas. Kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit. Filtrat disaring. Kedalam 5 mL filtrat ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N, terbentuk warna merah (positif kuinon).

Fraksi gabungan VI (etil asetat : metanol (60:140); (40:160); (20:180); (0:200)) dan pembandingan (*Rhei radix*) ditotolkan pada lempeng KLT silika gel GF<sub>254</sub> dan dielus dengan menggunakan butanol-asam asetat-air (50:10:40). Lempeng dikeringkan dan disemprot dengan KOH. Hasil positif bila terbentuk warna merah.



**Universitas Indonesia**

## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

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

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

Pada penelitian ini, simplisia yang digunakan adalah daun buni (*Antidesma bunius* L.) yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense (LIPI), Bogor, dengan tujuan untuk memastikan bahwa daun tersebut adalah bagian dari tanaman buni. Daun yang digunakan adalah daun yang berwarna hijau tua dan masih segar.

Daun buni yang diperoleh kemudian disortasi, dipisahkan dari pengotornya, dan dilap menggunakan lap kering hingga bersih. Setelah itu, dilakukan penimbangan berat daun buni, selanjutnya daun buni dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di dalam ruangan dengan sirkulasi udara yang baik dan terlindung dari sinar matahari langsung selama  $\pm 7$  hari. Selanjutnya dimasukkan ke dalam lemari pengering suhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$  selama 1 hari sebelum digunakan agar simplisia kering secara homogen. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air pada simplisia agar terhindar dari pembusukkan yang dapat menurunkan mutu simplisia dan mematikan jaringan tumbuhan untuk mencegah terjadinya hidrolisis terhadap kandungan senyawa simplisia oleh enzim (Harborne, 1987). Simplisia yang telah kering disortasi kembali untuk memisahkan benda-benda asing yang tidak diinginkan. Kemudian, daun buni yang telah disortir tersebut di buat menjadi serbuk dengan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh. Penyerbukkan simplisia dilakukan untuk meningkatkan kontak pelarut dalam melarutkan senyawa yang ada pada simplisia. Serbuk simplisia selanjutnya disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya untuk mencegah terjadinya kerusakan.

##### **4.1.2 Ekstraksi Simplisia**

Ekstraksi dilakukan dengan cara refluks menggunakan pelarut etanol 80%. Refluks dilakukan karena waktu yang dibutuhkan untuk ekstraksi lebih cepat dan ekstrak yang diperoleh lebih banyak, sedangkan pencampuran air dan etanol dimaksudkan agar proses difusi senyawa-senyawa dari dalam sel menuju pelarut

lebih mudah karena dapat menginduksi pembengkakan partikel tumbuhan serta meningkatkan porositas dinding sel. Selain itu, etanol juga memiliki kemampuan yang tinggi untuk mengekstraksi hampir semua senyawa bahan alam dengan berat molekul rendah (Samuelsson, 1999).

Pada ekstraksi cara refluks, serbuk yang telah ditimbang sebanyak 593,7 g dimasukkan secara terbagi ke dalam Erlenmeyer (setiap Erlenmeyer berisi  $\pm$  40 gram serbuk simplisia) dan ditambahkan dengan pelarut etanol 80% setinggi 3-5 cm di atas serbuk simplisia. Selanjutnya, dipanaskan hingga mencapai titik didih etanol, yaitu 70<sup>0</sup>C. Uap yang terbentuk akan kembali turun ke dalam Erlenmeyer dengan adanya pendingin balik yang dialiri oleh air.

Refluks dilakukan selama 1 jam dan filtrat yang diperoleh kemudian disaring agar terpisah dari residunya. Selanjutnya, residu di refluks kembali hingga tiga kali untuk memperoleh ekstrak yang lebih banyak. Refluks dilakukan sebanyak 45 kali. Ekstrak yang didapatkan kemudian di evaporasi pelarutnya pada suhu 40-50<sup>0</sup> C sehingga didapatkan ekstrak kental. Selanjutnya, berat ekstrak kental ditimbang dan berat tersebut digunakan untuk menghitung rendemen (perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal) yang dapat dilihat pada Tabel 4.1.

#### 4.1.3 Fraksinasi Partisi Cair-cair

Fraksinasi ekstrak kental etanol dilakukan dengan corong pisah menggunakan pelarut yang kepolarannya semakin meningkat secara berturut-turut dari non-polar hingga polar, yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol.

Sebanyak 71,82 g ekstrak kental etanol didispersikan terlebih dahulu dengan air hangat (suhu 40<sup>0</sup>-50<sup>0</sup> C) sambil digerus menggunakan mortir dan lumpang. Hal ini dilakukan karena ekstrak etanol yang terbentuk sulit terdispersi pada air hangat sehingga diperlukan bantuan dengan penggerusan. Selanjutnya, ekstrak yang telah terdispersi dalam air hangat tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan dengan pelarut n-heksana dengan perbandingan 1:1 agar pemisahan yang terjadi antara lapisan n-heksana dengan lapisan air terlihat jelas, lalu dikocok selama  $\pm$  15 menit. Pengocokan yang dilakukan tidak terlalu kuat dan tidak terlalu lama karena jika pengocokan dilakukan terlalu kuat dan terlalu lama, maka akan terbentuk lapisan busa. Setelah dikocok, selanjutnya fraksinasi

partisi didiamkan hingga diperoleh dua lapisan yang memisah yaitu lapisan n-heksana yang berada di atas karena n-heksana memiliki berat jenis yang jauh lebih rendah daripada air yang berada di bawah. Fraksinasi dilakukan 10 kali hingga didapatkan lapisan n-heksana tidak lagi menarik senyawa-senyawa (lapisan n-heksana tidak berwarna). Selanjutnya, lapisan n-heksana yang diperoleh tersebut dikumpulkan, diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu  $40^{\circ}$ - $50^{\circ}$  C, dan diperoleh fraksi n-heksana.

Lapisan air yang diperoleh difraksinasi kembali menggunakan pelarut etil asetat dengan cara yang sama dengan fraksinasi oleh pelarut n-heksana dan diperoleh fraksi etil asetat. Fraksinasi dengan etil asetat dilakukan sebanyak 6 kali hingga didapatkan lapisan etil asetat tidak lagi menarik senyawa-senyawa.

Lapisan air yang diperoleh dari hasil fraksinasi partisi oleh pelarut etil asetat kemudian dibuat menjadi kering menggunakan *freeze drier* selama  $\pm$  3 hari, ditambahkan sedikit metanol, lalu metanol diuapkan dengan bantuan *oven vacuum* dan diperoleh fraksi metanol. Fraksi-fraksi tersebut kemudian ditimbang (Tabel 4.2).

#### 4.2 Uji Pendahuluan Aktivitas Enzim $\alpha$ -glukosidase

Sebelum dilakukan uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase, terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan yang meliputi penentuan panjang gelombang p-nitrofenol, optimasi aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan variasi konsentrasi substrat, optimasi aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan variasi pH, dan optimasi aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan variasi konsentrasi suhu.

Pada penentuan panjang gelombang maksimum, larutan enzim yang digunakan adalah 0,15 U/mL dengan konsentrasi substrat 10 mM sesuai dengan data informasi produk dari sigma. Berdasarkan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-VIS, didapatkan bahwa panjang gelombang untuk pengukuran absorbansi p-nitrofenol adalah 400 nm (Gambar 4.5). Panjang gelombang tersebut digunakan pada pengukuran absorbansi selanjutnya.

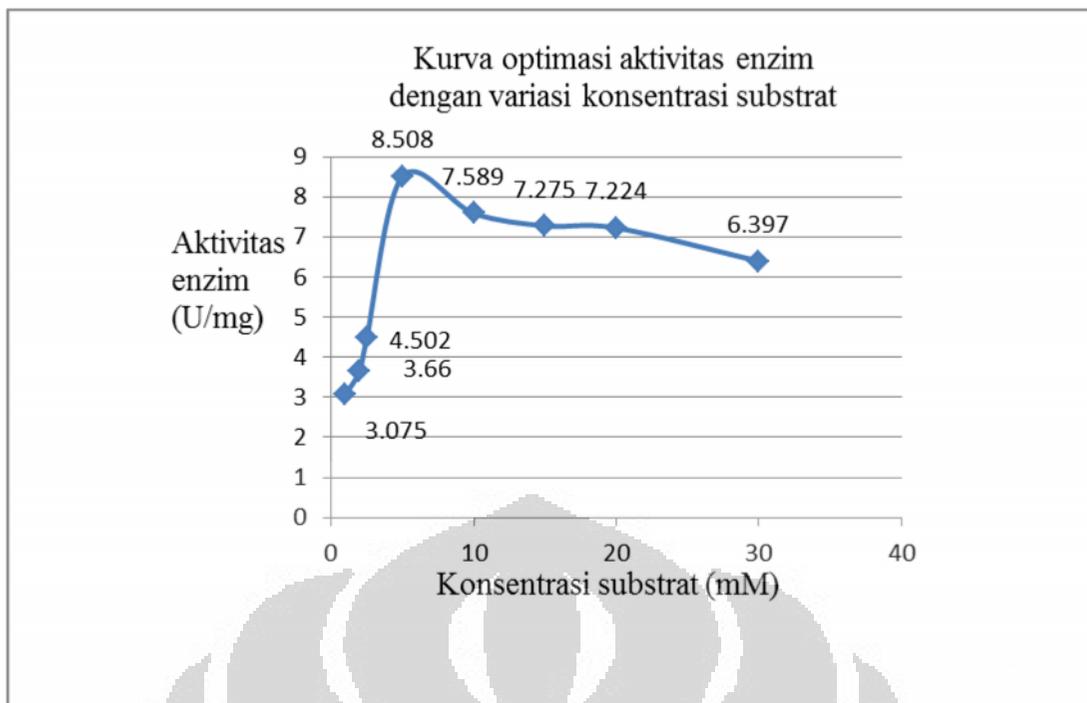
Optimasi aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dilakukan dengan beberapa variabel, yaitu variasi konsentrasi substrat, variasi pH, dan variasi suhu. Optimasi tersebut perlu dilakukan untuk memperoleh kondisi dimana enzim bekerja secara optimum

karena kerja enzim sangat dipengaruhi oleh hal-hal tersebut. Hasil optimasi tersebut digunakan untuk uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase.

#### 4.2.1 Optimasi Aktivitas $\alpha$ -glukosidase dengan Variasi Konsentrasi Substrat

Pada optimasi  $\alpha$ -glukosidase dengan variasi konsentrasi substrat, dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan berbagai konsentrasi substrat yaitu 1; 2; 2,5; 5; 10; 15; 20; dan 30 mM. Pada saat konsentrasi substrat yang sangat rendah dengan semua kondisi dipertahankan konstan, kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim juga sangat rendah. Kecepatan akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat hingga diperoleh bahwa kecepatan tersebut akhirnya akan mencapai titik batas. Setelah titik batas tersebut dilampaui, kecepatan reaksi hanya akan meningkat sedemikian kecil dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Berapapun tingginya konsentrasi substrat setelah titik tersebut tercapai, kecepatan reaksi akan mendekati, tetapi, tidak akan pernah mencapai garis maksimum. Hal ini menggambarkan bahwa enzim telah jenuh oleh substratnya karena seluruh sisi aktif enzim telah terisi oleh substrat. Berdasarkan pengukuran yang dilakukan, aktivitas enzim semakin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat dan aktivitas enzim tertinggi diperoleh pada saat konsentrasi substrat 5 mM. Namun, pada konsentrasi substrat lebih tinggi dari 5 mM, yaitu 10 sampai 30 mM, aktivitas enzim menurun secara perlahan (Gambar 4.1). Hal tersebut mungkin disebabkan karena terbentuknya produk inhibitor dari reaksi yang dikatalisis oleh enzim, yaitu p-nitrofenol dan  $\alpha$ -D-glukopiranosida yang memiliki kemiripan struktur dengan substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida sehingga kompetisi antara senyawa-senyawa tersebut untuk dapat menempati sisi aktif enzim mungkin terjadi.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, konsentrasi substrat 5 mM memberikan aktivitas enzim tertinggi yaitu 8,508 U/mg. Pada optimasi selanjutnya dan pada uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase, konsentrasi substrat yang digunakan adalah 5 mM. Data optimasi aktivitas enzim dengan variasi konsentrasi substrat dapat dilihat pada Tabel 4.3



**Gambar 4.1.** Kurva Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Konsentrasi Substrat 1 sampai 30 mM.

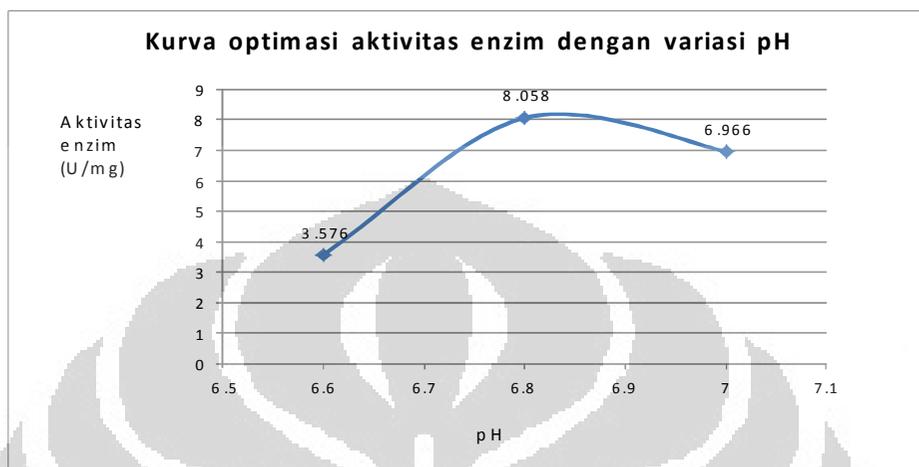
#### 4.2.2 Optimasi Aktivitas $\alpha$ -glukosidase dengan Variasi pH

Optimasi aktivitas enzim dengan variasi pH perlu dilakukan karena pH adalah salah satu variabel yang mempengaruhi aktivitas enzim dimana setiap enzim memiliki pH optimum yang spesifik dan pH optimum setiap enzim berbeda-beda.

Profil aktivitas pH enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan. Berdasarkan literatur, pH yang biasa digunakan adalah 6,8 dan 7,0. Oleh karena itu, pada optimasi aktivitas  $\alpha$ -glukosidase ini, pH yang digunakan adalah 6,6; 6,8; dan 7,0. Adapun penambahan variasi pH 6,6 dimaksudkan untuk menyempurnakan kurva agar dapat diperoleh pH yang memberikan aktivitas enzim tertinggi. Berdasarkan hasil yang diperoleh, serapan yang dihasilkan dari larutan dengan pH 7,0 memberikan serapan yang lebih dari 0,8, yaitu 1,065. Sehingga, dilakukan pengujian kembali pada pH tersebut dengan pengenceran 50 % menggunakan dapar fosfat pH 7,0. Hasil yang diperoleh adalah terdapat peningkatan aktivitas enzim hingga mencapai pH 6,8 dan menurun pada

**Universitas Indonesia**

pH berikutnya, yaitu pH 7,0 (Gambar 4.2). Penurunan aktivitas terjadi karena pada kondisi pH yang ekstrim dapat terjadi denaturasi enzim (Champe, Harvey, & Ferrier, 2010). Data optimasi aktivitas enzim dengan variasi pH dapat dilihat pada Tabel 4.4.



**Gambar 4.2.** Kurva Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi pH, yaitu 6,6; 6,8; dan 7,0.

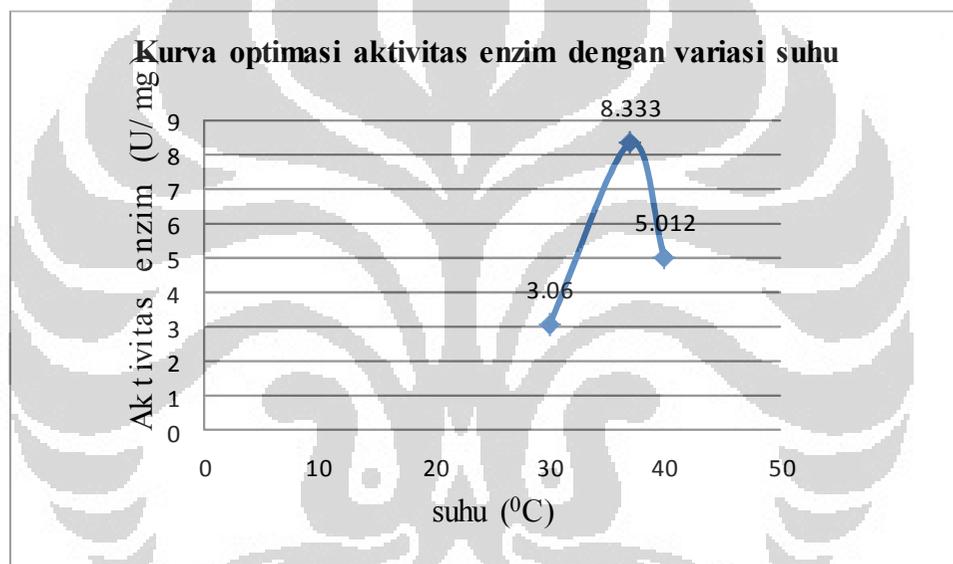
Berdasarkan hasil yang diperoleh, pada saat pH 6,8 dicapai aktivitas enzim tertinggi yaitu 8,058 U/mg. pH 6,8 tersebut digunakan pada optimasi selanjutnya dan uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase.

#### 4.2.3 Optimasi Aktivitas $\alpha$ -glukosidase dengan Variasi Suhu

Setelah diperoleh konsentrasi substrat dan pH yang memberikan aktivitas optimum enzim, dilakukan optimasi aktivitas enzim dengan variasi suhu karena suhu adalah salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim. Peningkatan suhu akan meningkatkan laju reaksi karena meningkatnya energi kinetik dan frekuensi tumbukan molekul-molekul yang bereaksi. Namun, peningkatan suhu yang terlalu tinggi dapat menurunkan laju reaksi yang disebabkan denaturasi enzim.

Suhu yang biasa digunakan dalam berbagai literatur dan dalam data informasi produk dari Sigma adalah 37<sup>0</sup>C. Namun, ada pula literatur yang menggunakan suhu 30 dan 45<sup>0</sup>C. Oleh karena itu, variasi suhu yang digunakan

adalah 30, 37, 40, dan 45<sup>0</sup>C. Adanya suhu 40<sup>0</sup>C dimaksudkan untuk menyempurnakan kurva yang terbentuk. Hasil yang diperoleh menunjukkan adanya peningkatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada suhu 30<sup>0</sup>C dengan aktivitas enzim 3,06 U/mL hingga suhu 37<sup>0</sup>C dengan aktivitas enzim 8,333 U/mL dan terjadi penurunan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang cukup signifikan pada suhu 40<sup>0</sup>C, yaitu menjadi 5,012 U/mL (Gambar 4.3). Oleh karena pada suhu 40<sup>0</sup>C telah terjadi penurunan aktivitas yang cukup signifikan, maka percobaan pada suhu 45<sup>0</sup>C tidak dilakukan. Suhu yang digunakan untuk uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase adalah suhu 37<sup>0</sup>C. Data optimasi aktivitas enzim dengan variasi suhu dapat dilihat pada Tabel 4.5.



**Gambar 4.3.** Kurva Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi suhu (30, 37, dan 40<sup>0</sup>C).

#### 4.3 Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -glukosidase dari Fraksi Hasil Partisi Cair-cair

Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dilakukan pada tiga fraksi hasil partisi cair-cair yaitu fraksi n-heksana, etil asetat, dan metanol. Konsentrasi ekstrak yang digunakan bervariasi yaitu mulai dari 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; dan 0,01563%. Hal ini bertujuan untuk memperoleh nilai persen inhibisi yang digunakan untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub> (konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50 % aktivitas enzim) dari setiap ekstrak dan nilai IC<sub>50</sub> tersebut di-

gunakan untuk mengetahui kekuatan penghambatan ekstrak terhadap enzim. Ekstrak yang memiliki nilai  $IC_{50}$  paling rendah merupakan ekstrak yang memiliki kemampuan menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase paling tinggi.

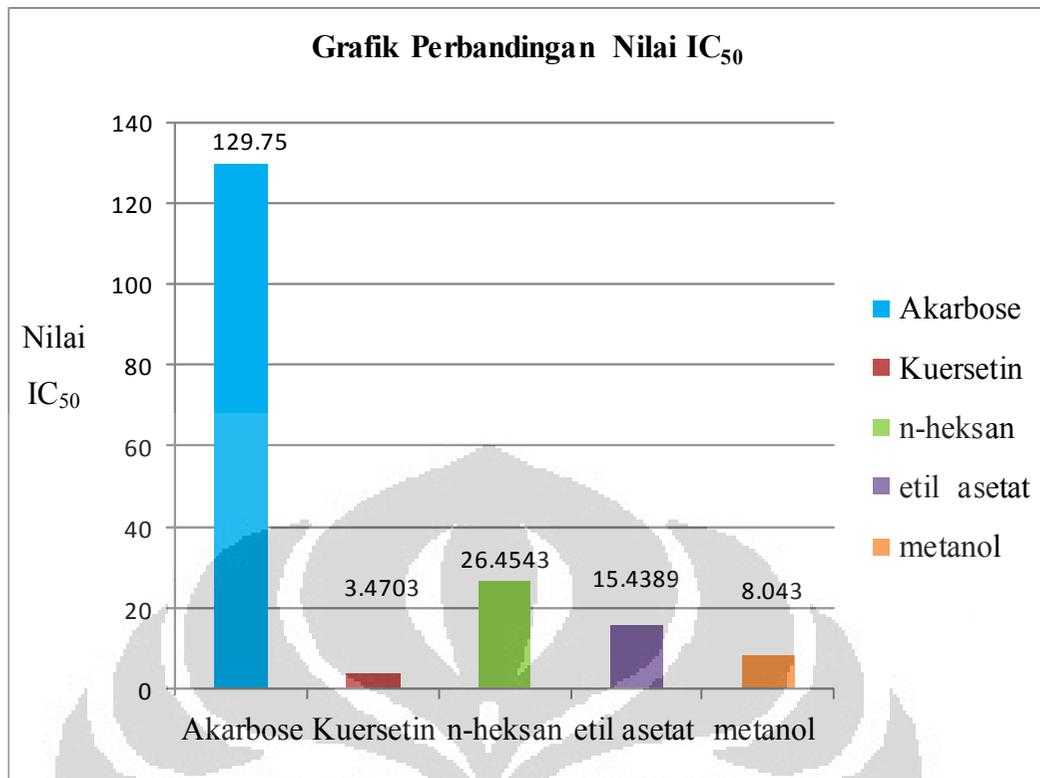
Pada uji ini, dilakukan pengukuran absorbansi sampel (S) dan absorbansi blanko (B). Pada pengukuran absorbansi blanko, digunakan DMSO sebagai pengganti larutan ekstrak/pembanding. Sedangkan, pada pengukuran absorbansi sampel (S), DMSO digantikan dengan larutan ekstrak/pembanding. Perlakuan pada pengukuran absorbansi sampel (S) dan blanko (B) adalah sama, yaitu menggunakan kontrol sampel dan kontrol blanko sebagai faktor koreksi untuk melihat apakah produk masih dapat terbentuk setelah larutan dibasakan terlebih dahulu dengan penambahan natrium karbonat serta sebagai faktor koreksi terhadap nilai serapan sampel maupun blanko karena warna ekstrak juga dapat memberikan serapan pada panjang gelombang tersebut. Absorbansi p-nitrofenol yang terbentuk diukur pada panjang gelombang 400 nm.

Nilai persen inhibisi dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel (S) dengan absorbansi blanko (B). Selanjutnya, nilai persen inhibisi tersebut digunakan untuk menghitung nilai  $IC_{50}$ .

Sebelum dilakukan uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada fraksi, terlebih dahulu dilakukan uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada akarbose sebagai pembanding karena akarbose adalah obat penghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang umum digunakan di Indonesia, mudah didapatkan, dan banyak digunakan sebagai pembanding pada berbagai literatur (Shinde et al, 2008; Luo, Wang, Wang, Ma, & Li, 2012; Yuefei, Shuangru, Shuhong, Lisheng, & Ping, 2012).

Uji terhadap fraksi n-heksana, etil asetat, dan metanol dilakukan setelah diperoleh nilai  $IC_{50}$  akarbose. Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh dari setiap fraksi dibandingkan dengan nilai  $IC_{50}$  akarbose untuk melihat apakah fraksi memiliki kemampuan menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase. Hasil uji menunjukkan bahwa akarbose yang memiliki kemampuan menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase memiliki nilai  $IC_{50}$  129,75 ppm. Nilai tersebut cukup tinggi jika dibandingkan dengan nilai  $IC_{50}$  ketiga fraksi yang diuji. Fraksi yang memiliki nilai  $IC_{50}$  paling rendah adalah fraksi metanol dengan nilai 8,0430 ppm. Sedangkan, fraksi

heksana dan etil asetat memiliki nilai  $IC_{50}$  26,4543 ppm dan 15,4389 ppm (Data nilai  $IC_{50}$  dapat dilihat pada Tabel 4.6, 4.8-4.10). Perbedaan nilai  $IC_{50}$  akardose yang terlalu jauh dengan fraksi uji mungkin disebabkan karena akardose merupakan penghambat  $\alpha$ -glukosidase yang memiliki efek inhibisi yang tinggi terhadap  $\alpha$ -glukosidase mamalia tetapi tidak memiliki efek inhibisi terhadap  $\alpha$ -glukosidase dari *Saccharomyces cerevisiae* dan *Bacillus stearothermophilus*. Sedangkan, katekin memiliki efek inhibisi terhadap *Saccharomyces cerevisiae* dan *Bacillus stearothermophilus* tetapi tidak memiliki efek inhibisi terhadap  $\alpha$ -glukosidase mamalia (Kim, Nam, Kurihara, & Kim, 2008). Selain katekin, kuersetin juga memiliki efek inhibisi terhadap  $\alpha$ -glukosidase dari *Saccharomyces cerevisiae* dengan nilai  $IC_{50}$  kurang dari  $15\mu\text{M}$  (Kumar, Narwal, Kumar, & Prakash, 2011) sehingga dilakukan pula uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada kuersetin dan diperoleh nilai  $IC_{50}$  3,4703 ppm (Tabel 4.7). Jika dibandingkan dengan kuersetin, nilai  $IC_{50}$  fraksi n-heksana, etil asetat, dan metanol memiliki nilai yang lebih tinggi. Hal tersebut mungkin dikarenakan kuersetin merupakan senyawa golongan flavonoid yang sudah murni sehingga memiliki kemampuan menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang jauh lebih tinggi daripada ketiga fraksi tersebut. Data perbandingan nilai  $IC_{50}$  dapat dilihat pada Gambar 4.4.



**Gambar 4.4.** Grafik Perbandingan nilai IC<sub>50</sub> Pembanding (Akarbose dan Kuersetin) dengan fraksi n-heksana, etil asetat, dan metanol.

#### 4.4 Fraksinasi Menggunakan Kromatografi Kolom

Fraksi metanol di fraksinasi kembali menggunakan kromatografi kolom dengan bantuan vakum. Hal ini dilakukan karena pemisahan yang dilakukan adalah pemisahan tahap awal sehingga tidak perlu diperoleh hasil yang murni dan waktu yang dibutuhkan lebih singkat.

Pada kromatografi kolom tersebut, digunakan fase diam silika gel 60 H sebanyak 77 gram. Fraksi metanol sebanyak 9,3436 gram terlebih dahulu dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan serbuk silika gel 60 sebanyak 9,2729 gram. Selanjutnya, fraksi yang telah menjadi serbuk tersebut dimasukkan ke dalam kolom yang berisi silika gel yang telah dipadatkan dan telah dielusi dengan etil asetat 100%. Teknik elusi yang digunakan adalah teknik elusi gradien menggunakan campuran pelarut etil asetat dan metanol dengan berbagai perbandingan mulai dari etil asetat 100% sampai dengan metanol 100% (Perbandingan eluen yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 4.14). n-Heksana tidak diguna-

kan sebagai eluen karena n-heksana bersifat sangat non-polar, sedangkan fraksi yang dikromatografi kolom adalah fraksi metanol yang jauh lebih polar daripada n-heksana.

Fraksi hasil kromatografi kolom tersebut ditampung dalam vial-vial. Jumlah fraksi kolom yang diperoleh adalah 20 fraksi.

#### 4.5 Penggabungan Fraksi Kolom

Kromatografi lapis tipis dilakukan pada fraksi hasil kolom untuk menggabungkan fraksi yang memiliki pola kromatogram yang sama. Fraksi tersebut ditotolkan pada lempeng silika gel GF<sub>254</sub> dan dielusi dengan berbagai pelarut hingga diperoleh pola kromatogramnya. Fraksi 1 sampai 12 dielusi menggunakan pelarut etil asetat dan metanol (8:2). Sedangkan, fraksi 13 sampai 20 dielusi menggunakan pelarut butanol; asam asetat; dan air (4:1:5). Fraksi yang memiliki pola kromatogram yang sama digabungkan dan jumlah fraksi gabungan yang terbentuk adalah enam fraksi gabungan, yaitu fraksi I (gabungan fraksi 1-2); fraksi II (gabungan fraksi 3-5); fraksi III (gabungan fraksi 6-11); fraksi IV (gabungan fraksi 12-14); fraksi V (gabungan fraksi 15-16); dan fraksi VI (gabungan fraksi 17-20). Data penggabungan fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.14.

#### 4.6 Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -glukosidase

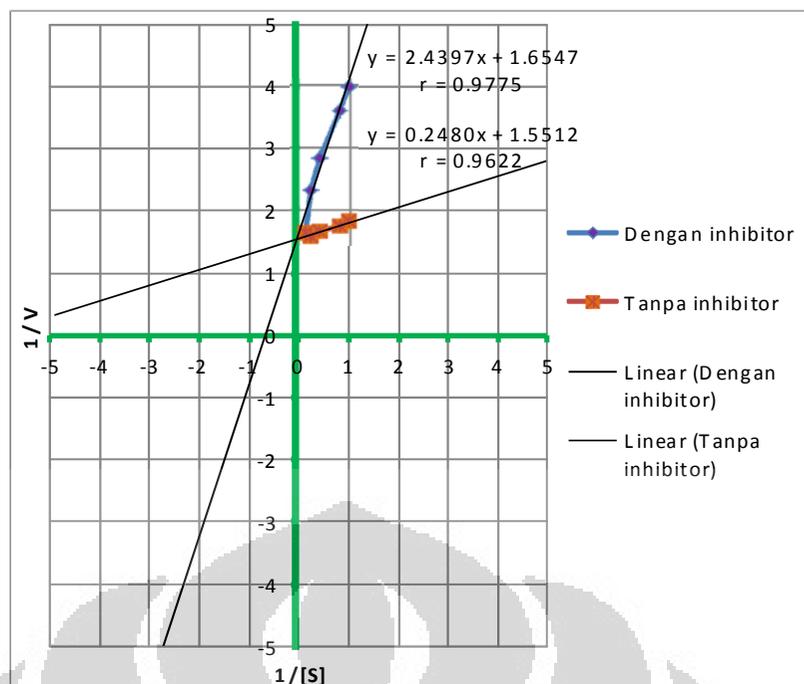
Uji kinetika dilakukan untuk melihat jenis penghambatan ekstrak terhadap enzim. Jenis penghambatan tersebut terbagi menjadi tiga, yaitu kompetitif, non kompetitif, ataupun gabungan keduanya.

Pada uji kinetika penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase, pengukuran dilakukan dengan meningkatkan konsentrasi substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida dengan ada maupun tanpa adanya ekstrak dengan berbagai konsentrasi substrat (Elya, Basah, Mun'im, Yuliatuti, Bangun, & Septiana, 2012).

Penentuan jenis penghambatan dilakukan dengan analisis data melalui plot Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten (Elya, Basah, Mun'im, Yuliatuti, Bangun, & Septiana, 2012) yang dihitung berdasarkan persamaan regresi  $y = a + b x$ ,  $1/[S]$  sebagai sumbu x dan  $1/A$  sebagai sumbu y (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).

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

Konsentrasi larutan ekstrak metanol yang digunakan pada uji ini adalah 8,375 ppm dengan berbagai konsentrasi substrat yang ditingkatkan dari 1; 1.25; 2.5; 5; dan 10 mM. Pengujian tanpa inhibitor juga dilakukan dengan variasi konsentrasi yang sama. Selanjutnya, data yang diperoleh dihitung berdasarkan persamaan regresi  $y = a + b x$ ,  $1/[S]$  sebagai sumbu x dan  $1/V$  sebagai sumbu y untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten. Berdasarkan plot Lineweaver-Burk, terdapat perpotongan kedua persamaan garis pada sumbu y (Gambar 4.4) dan nilai  $V_{max}$  yang diperoleh dari kedua persamaan garis tersebut saling mendekati (Perhitungan tetapan Michaelis-Menten dapat dilihat pada Tabel 4.11-4.13). Hal ini menunjukkan bahwa jenis inhibisi ekstrak metanol adalah inhibisi kompetitif dimana inhibitor memiliki struktur yang mirip dengan substrat sehingga berkompetisi dengan substrat untuk menempati sisi aktif enzim.



**Gambar 4.5.** Plot Lineweaver-Burk Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Metanol Daun Buni 8,375 ppm (0,25%).

#### 4.7 Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -glukosidase Fraksi Kolom

Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dilakukan pada keenam fraksi gabungan dengan prosedur yang sama pada uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada fraksi hasil partisi. Hasil uji menunjukkan bahwa fraksi gabungan VI adalah fraksi yang memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase paling kuat dibandingkan 5 fraksi lainnya dengan nilai  $IC_{50}$  4,7863 ppm. Data hasil uji dapat dilihat pada Tabel 4.15-4.19.

#### 4.8 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia pada Ekstrak Etanol, Fraksi Metanol, dan Fraksi Gabungan VI.

Identifikasi golongan senyawa kimia bertujuan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak. Hasil identifikasi tersebut dapat dijadikan acuan untuk memperkirakan golongan senyawa kimia apa yang memberikan kemampuan untuk menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase. Identifikasi ini dilakukan pada ekstrak etanol, fraksi metanol dan fraksi gabungan VI (etil asetat : metanol (60:140); (40:160); (20:180); (0:200)). Hal ini dilakukan untuk melihat apakah ada perbedaan kandungan golongan senyawa kimia. Hasil

identifikasi golongan senyawa kimia dapat dilihat di Tabel 4.21. Pada identifikasi tersebut, sampel dibandingkan dengan kontrol positif untuk melihat ada atau tidaknya golongan senyawa yang diuji.

Identifikasi golongan senyawa kimia dilakukan dengan dua cara, yaitu reaksi warna dan kromatografi lapis tipis. Hal ini dilakukan untuk lebih memastikan keberadaan senyawa yang diuji karena kromatografi lapis tipis memberikan hasil yang lebih spesifik dengan jumlah sampel yang lebih sedikit.

#### 4.8.1 Ekstrak Etanol dan Fraksi Metanol

Pada identifikasi golongan senyawa kimia menggunakan reaksi warna, ekstrak etanol dan fraksi metanol memberikan hasil yang positif untuk golongan senyawa gula dengan terbentuknya cincin ungu pada reaksi Mollisch, saponin dengan terbentuknya busa dengan tinggi  $\pm 2$  cm yang tidak hilang dengan penambahan HCl 2N (Gambar 4.10), dan positif adanya gugus fenol dengan terbentuknya warna hitam setelah penambahan  $\text{FeCl}_3$  (Tabel 4.22 dan Gambar 4.6). Gugus fenol yang terdapat pada ekstrak etanol dan fraksi metanol diidentifikasi lebih lanjut untuk mengetahui golongan senyawa yang memberikan hasil positif adanya gugus fenol tersebut.

**Tabel 4.22** Nilai Rf bercak yang memberikan hasil positif adanya gugus fenol

Nama	Rf
Kontrol positif (Theae folium)	0,9048
Ekstrak Etanol	0,4921
	0,1905
Ekstrak Metanol	0,1429

Uji untuk golongan flavonoid yang dilakukan dengan reaksi warna memberi hasil negatif baik pada ekstrak etanol maupun pada fraksi metanol. Oleh karena itu, dilakukan identifikasi golongan flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis dengan eluen butanol : asam asetat : air (40:10:50). Lempeng yang telah dielusi selanjutnya disemprot dengan  $AlCl_3$ . Hasil positif jika bercak berfluoresensi kuning pada panjang gelombang 366 nm (Wagner, Bladt, Zgainski, 1984). Berdasarkan uji tersebut, ekstrak etanol dan fraksi metanol memberikan hasil positif (Tabel 4.23 dan Gambar 4.9) jika dibandingkan dengan kontrol positif (*Orthosiphonus folium*).

**Tabel 4.23** Nilai Rf bercak yang memberikan hasil positif adanya golongan senyawa flavonoid

Nama	Rf
Kontrol positif ( <i>Orthosiphonus folium</i> )	0,7619
Ekstrak Etanol	0,5079
Ekstrak Metanol	0,6667
	0,5079
	0,2381

Uji untuk golongan tannin dilakukan dengan menggunakan gelatin 10%. Hasil dikatakan positif adanya tannin jika terbentuk endapan putih karena tannin dapat membentuk kopolimer yang tidak larut air dengan protein (Harborne, 1987). Berdasarkan uji golongan senyawa tannin, ekstrak etanol dan fraksi metanol mengandung golongan senyawa tannin jika dibandingkan dengan kontrol positif yaitu *Theae folium* (Gambar 4.8).

#### 4.8.2 Fraksi Gabungan VI(etil asetat : metanol (60:140); (40:160); (20:180); (0:200))

Pada identifikasi golongan senyawa kimia menggunakan reaksi warna, fraksi gabungan VI memberikan hasil yang positif untuk golongan senyawa gula dengan terbentuknya cincin ungu pada rekasi Mollisch, dan positif adanya gugus fenol dengan terbentuknya warna hitam pada bercak dengan Rf 0,2222 setelah disemprot  $\text{FeCl}_3$  (Gambar 4.7). Gugus fenol yang terdapat pada fraksi gabungan diidentifikasi lebih lanjut untuk mengetahui golongan senyawa yang memberikan hasil positif adanya gugus fenol tersebut.

Uji golongan senyawa flavonoid dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis karena jumlah sampel sedikit. Prosedur identifikasi yang dilakukan sama dengan prosedur identifikasi golongan senyawa flavonoid pada ekstrak dan fraksi metanol. Hasil menunjukkan positif adanya golongan senyawa flavonoid (Tabel 4.24 dan Gambar 4.9)

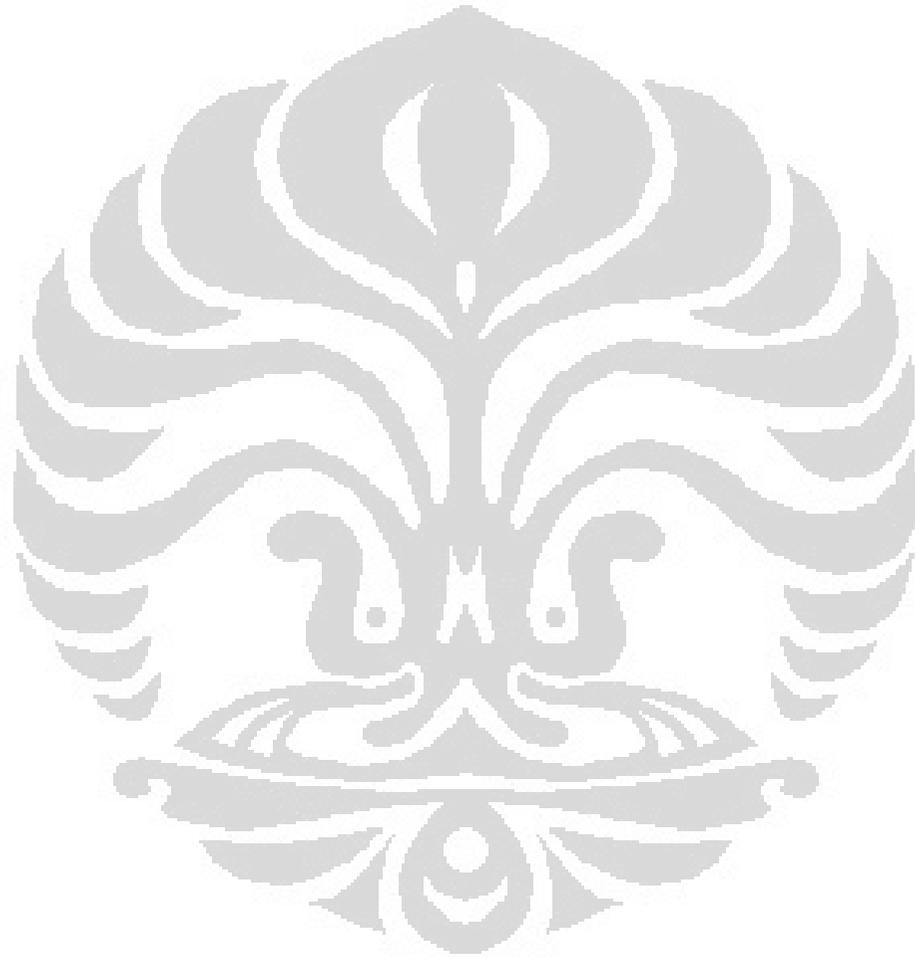
**Tabel 4.24** Nilai Rf bercak yang memberikan hasil positif adanya golongan senyawa flavonoid

Nama	Rf
Kontrol positif (Orthosiphonus folium)	0,7619
Fraksi Gabungan VI	0,6667

Berdasarkan hasil uji, senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak etanol dan fraksi metanol adalah sama, yaitu tannin, flavonoid, saponin, dan gula. Sedangkan pada fraksi gabungan VI, hanya terdapat dua golongan senyawa kimia, yaitu flavonoid dan gula. Hal tersebut menunjukkan bahwa hasil pemisahan dengan kromatografi kolom lebih baik daripada hasil pemisahan dengan fraksinasi partisi cair-cair. Hampir semua golongan senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi metanol maupun fraksi gabungan VI merupakan senyawa-senyawa yang biasanya memiliki kemampuan menghambat aktivitas  $\alpha$ -

glukosidase karena golongan senyawa tersebut bersifat polar (Nguyen et al, 2010).

Fraksi gabungan VI (etil asetat : metanol 60:140; 40:160; 20:180; 0:200) yang memiliki nilai  $IC_{50}$  4,7863 ppm (nilai terendah) mengandung senyawa golongan flavonoid dan gula. Berdasarkan literatur, flavonoid merupakan golongan senyawa kimia yang memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang tinggi karena golongan senyawa tersebut termasuk senyawa polifenol (Yuefei, Shuangru, Shuhong, Lisheng, & Ping, 2012).



## BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah :

- a. Fraksi metanol dan fraksi gabungan VI (etil asetat : metanol (60:140); (40:160); (20:180); (0:200)) memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tertinggi dengan nilai  $IC_{50}$  berturut-turut 8,0434 dan 4,7863 ppm.
- b. Fraksi metanol memiliki mekanisme penghambatan  $\alpha$ -glukosidase secara kompetitif.
- c. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia fraksi metanol daun buni menunjukkan adanya flavonoid, tannin, saponin, dan gula. Sedangkan, fraksi gabungan VI (etil asetat : metanol (60:140); (40:160); (20:180); (0:200)) mengandung flavonoid dan gula.

### 5.2. Saran

Hasil penelitian ini perlu didukung dengan penelitian lebih lanjut, seperti isolasi, karakterisasi, dan uji *in vivo* senyawa aktif daun buni sehingga tanaman tersebut dapat dikembangkan dalam mengobati penyakit diabetes melitus, khususnya penderita DM tipe 2.

## DAFTAR PUSTAKA

- British Pharmacopoeia Commission. (2009). *British Pharmacopoeia* (Vols.I&II). London: The Stationery Office, 66.
- Butkhub, L., & Samappito, S. (2008). An Analysis on Flavonoids Contents in Mao Luang Fruits of Fifteen Cultivars (*Antidesma bunius*), Grown in Northeast Thailand. *Pakistan Journal of Biological Science* 11(7), 996-1002.
- Champe, P., Harvey, R., & Ferrier, D. (2010). *Lippincott's Illustrated Reviews : Biochemistry* (Ed.3) . London: Wolters kluwer, 57-62.
- Corwin, E.J. (2001). *Buku Saku Patofisiologi.Ter. Dari Handbook of Pathophysiology oleh Brahm U. Pendit*. Jakarta: EGC, 542-557.
- Departemen Farmakologi dan Terapi FKUI. (2007). *Farmakologi dan Terapi edisi 5*. Jakarta: Gaya Baru, 490-494.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *DepKes RI Indonesia Jilid III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 712; 772; 755; 780-782.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995a). *DepKes RI Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 9.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995b). *Materia Medika Indonesia Volume VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, 333-337.
- Dipiro, Joseph T., Robert L. Talbert., Gary C. Yees., Gary R. Matzke., Barbara G. Wells., & L.Michael Posey. (2005). *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*. New York: McGraw-Hill, 1333; 1343; 1353.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. (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 melitus*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, 23-27.
- Elya, B., Basah, K., Mun'im, A., Yuliatuti, W., Bangun, A., & Septiana, E. K. (2012). Screening of  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activity from Some Plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 3-4.
- Farnsworth, N.R. (1966). *Biological and Phytochemical Screening of Plants*. *Journal of Pharmaceutical Science* 55(3), 226-276

- Gandjar, I. G., & Rohma, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, 353-355.
- Gao, Hong., Huang, Yi-Na., Gao, Bo; Xu, Pei-Yu; Inagaki, Chika; Kawabata, Jun. (2008).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food Chemistry* 106, 1195-1210.
- Gholamhoseinian, A., Fallah, H., Sharififar, F. (2009). Inhibitory effect of methanol extract of *Rosa damascena* Mill. flower on  $\alpha$ -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia in normal and diabetic rats. *Phytomedicine* 16, 935-941.
- G.N, Kim., J.G, Shin., & H.D, Jang. (2009). Antioxidant and antidiabetic activity of Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) extract treated with *Aspergillus saitoi*. *Food Chemistry* 117, 35-41.
- Guo, L.P., Jiang, T.F., Lv, Z.H., & Wang, Y.H. (2010). Screening  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from traditional Chinese drugs by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53, 1250-1253.
- Harborne, J.B. (1987). *Metode fitokimia. ter. dari Phytochemical methods oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro*. Bandung: Penerbit ITB, 5-6; 47-54; 70-71; 123-125; 155-156; 234-240.
- Hartati, S., Elya, B., & Najib, A. (2010). n-Butanol Fraction of *Acorus calamus* Rhizome Extract To Inhibit The Activity of  $\alpha$ -glucosidase. *J.Trop.Med.Plants.Vol 11 No.2*, 202.
- Henry, A., MT, S., & Yanuar, A. (2002). Analisis Spektrofotometri UV-Vis pada Obat Influenza dengan Menggunakan Aplikasi Sistem Persamaan Linier. *Komputer dan Sistem Intelijen*, (pp. 2-3). Jakarta.
- Hoffmann, P. (2006). *Antidesma* in Malesia and Thailand: 1—292. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Indonesian Institute of Sciences National Biological. (1985). *An Alphabetical List of Plant Species Cultivated in The Hortus Botanicus Bogoriensis*. Bogor : Indonesian Institute of Sciences National Biological, 19.
- Jones, S.B., & Luchsinger, A.E. (1987). *Plant Systematics* (2<sup>nd</sup> ed). New York: McGraw-Hill, 477; 480.
- 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, S., Narwal, S., Kumar, V., & Prakash, O. (2011, January-June).  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*, 20.

- Lam, S., Chen, J., Kang, C., Chen, C., & Lee, S. (2008).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from the seeds of *Syagrus romanzoffiana*. *Phytochemistry* 69, 1173-1178.
- Lehninger, Albert L. (1988). *Dasar-dasar Biokimia jilid 1* (M.Thenawidjaja, Trans pp.240-241; 247; 251-255). Jakarta : Erlangga.
- LIPI. (2009). *Pangan dan Kesehatan*. Bogor: UPT – Balai Informasi Teknologi LIPI.
- Luo, L., Wang, R., Wang, X., Ma, Z., & Li, N. (2012). Compounds from *Angelica keiskei* with NQO1 induction, DPPH scavenging and alpha-glucosidase inhibitory activities. *Food Chemistry* 131, 992-998.
- Manaharan, T., Appleton, D., Cheng, H., & Palanisamy, U. (2011). Flavonoids isolated from *Syzygium aqueum* leaf extract as potential antihyperglycaemic agents. *Food Chemistry*.
- Micor JRL, Deocarís C & Mojica E. (2005). Biological Activity of Bignay (*Antidesma bunius* (L.) Spreng) Crude Extract in *Artemia salina*. *Journal Medical Scientist* 5 (3): 195-198.
- Murray, Robert K, Daryl K.G., & Victor W.R. (2009). *Biokimia Harper edisi 27 terjemahan dari Harper's Biochemistry 27<sup>th</sup> oleh Brahm U.Pendit*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 65-69.
- Nguyen, X.N, Kiem, P.V, Minh, C.V, Ban, N.K, Cuong, N.X, Tung, N.H, Ha, L.M, Ha, D.T, Tai, B.H, & Quang, T.H. (2010).  $\alpha$ -Glucosidase inhibition properties of cucurbitane-type triterpene glycosides from the fruits of *Momordica charantia*. *Chem. Pharm. Bull.* 58, 720-724.
- Orwa., et al. (2009). Agroforestry Database 0.4: *Antidesma bunius* L Spreng. 1. 2 Februari 2012 pk.14.13.
- P, Sudha., Zinjarde, S. S., Bhargava, S. Y., & Kumar, A. R. (2011). Potent  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11:5, 2.
- Palanisamy, U., Manaharan, T., Teng, L. L., Radhakrishnan, A., Subramaniam, T., & Masilamani, T. (2011). Rambutan rind in the management of hyperglycemia. *Food Research International* 44, 2278-2282.
- Puspitasari, E., & Ulfa, E. U. (2009). Uji Sitotoksitas Ekstrak Metanol Buah Buni (*Antidesma bunius* (L) Spreng) terhadap Sel Hela. *Jurnal Ilmu Dasar* Vol.10 No.2, 181-185.
- Robinson, T. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi* (Ed ke-6) (K Padmawinata, Penerjemah.). Bandung: Penerbit ITB, 19; 57; 71; 191; 209-212; 281-288.
- Saker, Satyajit D., Latif, Z., Gray, Alexander I (Ed.). (2006). *Natural Products Isolation* (2<sup>nd</sup> ed). New Jersey: Humana Press, 117-135.

- Samuelsson, G. (1999). *Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy* (4<sup>th</sup> ed.). Swedia: Apotekarsocieteten, 46-47.
- Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Bo, H., Kumar, S., et al. (2008). alpha-Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto–Kakizaki (GK) rats. *Carbohydrate Research* 343, 1278-1281.
- Sigma-Aldrich. (1996). *Sigma Quality Control Test Procedure Enzimatic Assay of  $\alpha$ -Glucosidase*. februari 2012 pk.20.32. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DataSheetPage.do?brandKey=SIGMA&symbol=N1377>
- Si, Mei mei., et al. (2010). Insulin releasing and alpha-glucosidase inhibitory activity of ethyl acetate fraction of *Acorus calamus* in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology* 128, 154-159.
- Sosef, M., Hong, L., & Prawirohatmodjo, S. (1998). *Plant Resources of South-East Asia* (No.5(3)). Bogor: Prosea, 75-77.
- Sudoyo, A., Setiyohadi, B., Alwi, I, K, M., & Setiati, S. (2006). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam ed.IV jilid III*. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI, 1862.
- Sweetman, Sean C (Ed.). (2009). *Martindale The Complete Drug Reference*. Chicago : Pharmaceutical Press, 439.
- Tahrani, A., & Barnett, A. (2010). Dapagliflozin: a Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitor in Development for Type 2 Diabetes. *Diabetes Ther* 1(2), 45-56.
- Touchstone, J. C., & Dobbins, M. F. (1983). *Practice of Thin Layer Chromatography second edition*. New York: John Wiley & Sons Inc, 11.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, EM. (1984). *Plant Drug Analysis, a Thin Layer Chromatography Atlas*. New York: Springer-verlag, 51; 54; 74; 163-164; 188; 212; 225; 240; 299-304.
- Yuefei, W., Shuangru, H., Shuhong, S., Lisheng, Q., & Ping, X. (2012). Studies on bioactivities of tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel extracts: Antioxidant activity and inhibitory potential against alpha-glucosidase and alpha-amylase in vitro. *Industrial Crops and Products* 37, 520-526.
- Yuhao Li., Suping Wen., Kota, Bhavani Prasad., Gang Peng., George Qian Li., Johji Yamahara., & Roufogalis, Basil D.(2005). *Punica granatum* flower extract, a potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 239-244.
- Zhang, J.F., Zheng, Y.G., & Shen, Y.C. (2007). Inhibitory effect of valienamine on the enzymatic activity of honeybee (*Apis cerana* Fabr.) alpha-glucosidase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87, 73-77.

**Tabel 4.1.** Rendemen Ekstrak Etanol Tanaman Uji

Nama Tanaman	Berat Simplisia (g)	Berat Ekstrak Kental (g)	Rendemen (%)
Daun Buni	593,7	87,09	14,67

**Tabel 4.2.** Berat Ekstrak Hasil Fraksinasi

Nama Fraksi	Berat (g)
Fraksi Heksan	20,6943
Fraksi Etil Asetat	5,9721
Fraksi Metanol	16,8211

**Tabel 4.3.** Optimasi Aktivitas Enzim dengan Konsentrasi Substrat 1; 2; 2,5; 5; 15; 10; 20; 30 mM dengan larutan enzim 0,15 U/mL, suhu 37<sup>0</sup>C dan pH 6,8

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			

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

**Tabel 4.4.** Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi pH (6,6; 6,8; 7,0; 7,2) dan konsentrasi substrat 5 mM..

Dapar Fosfat		Serapan (A)		Serapan rata-rata	U-K	Aktivitas Enzim
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>			U/mg
pH 6,60	Uji (U)	0,3630	0,3602	0,3616	0,2727	3,576
	Kontrol (K)	0,0895	0,0883	0,0889		
pH 6,80	Uji (U)	0,6917	0,6943	0,693	0,6144	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	6,966
	Kontrol (K)	0,0457	0,0466	0,0462		

**Tabel 4.5.** Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Suhu (30; 37; 40<sup>0</sup>C) dan konsentrasi substrat 5 mM.

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

**Tabel 4.6.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Akarbose (sebagai Pem-banding)

Konsentrasi		Serapan (A)		Serapan rata-rata	S <sub>1</sub> -S <sub>0</sub>	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
Blanko (tanpa ek- strak)	S <sub>1</sub>	0,7170	0,7137	0,7154	0,6532		
	S <sub>0</sub>	0,0625	0,0618	0,0622			
2% (66,67 ppm)	S <sub>1</sub>	0,5125	0,5044	0,5085	0,4652	28,78	129,75
	S <sub>0</sub>	0,0463	0,0402	0,0433			
1% (33,33 ppm)	S <sub>1</sub>	0,6073	0,6016	0,6045	0,5557	14,93	
	S <sub>0</sub>	0,0496	0,0480	0,0488			
0,5% (16,67 ppm)	S <sub>1</sub>	0,6321	0,6307	0,6314	0,5794	11,30	
	S <sub>0</sub>	0,0508	0,0531	0,0520			
0,25% (8,33 ppm)	S <sub>1</sub>	0,6527	0,6505	0,6516	0,5938	9,1	
	S <sub>0</sub>	0,0566	0,0590	0,0578			
0,125% (4,17 ppm)	S <sub>1</sub>	0,6785	0,6720	0,6753	0,6130	6,15	
	S <sub>0</sub>	0,0631	0,0614	0,0623			
0,0625% (2,08 ppm)	S <sub>1</sub>	0,6818	0,6823	0,6821	0,6162	5,66	
	S <sub>0</sub>	0,0652	0,0665	0,0659			
Persamaan regresi					y = 5,0799 + 0,3462x r = 0,9934		

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

**Tabel 4.7.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Kuersetin (sebagai Pembanding)

Konsentrasi		Serapan (A)		Serapan rata-rata	S <sub>1</sub> -S <sub>0</sub>	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
Blanko (tanpa ekstrak)	S <sub>1</sub>	0,6963	0,6926	0,6945	0,6285		
	S <sub>0</sub>	0,0665	0,0654	0,0660			
3,33 ppm	S <sub>1</sub>	0,3667	0,3605	0,3636	0,3128	50,24	3,4703
	S <sub>0</sub>	0,0511	0,0506	0,05085			
2,5 ppm	S <sub>1</sub>	0,4514	0,4529	0,4522	0,4012	36,17	
	S <sub>0</sub>	0,0502	0,0518	0,051			
2,22 ppm	S <sub>1</sub>	0,4921	0,4907	0,4914	0,4416	29,74	
	S <sub>0</sub>	0,0502	0,0493	0,0498			
1,67 ppm	S <sub>1</sub>	0,5695	0,5751	0,5723	0,5144	22,18	
	S <sub>0</sub>	0,0592	0,0566	0,0579			
0,83 ppm	S <sub>1</sub>	0,6040	0,6082	0,6061	0,545	13,29	
	S <sub>0</sub>	0,0603	0,0619	0,0611			
0,42 ppm	S <sub>1</sub>	0,6458	0,6454	0,6456	0,58	7,72	
	S <sub>0</sub>	0,0659	0,0652	0,0656			
Persamaan regresi					$y = 0,4523 + 14,2777x$ $r = 0,9926$		

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

**Tabel 4.8.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi n-heksana  
Fraksi n-heksana yang ditimbang sebanyak 100,1 mg

Konsentrasi		Serapan (A)		Serapan rata-rata	S <sub>1</sub> -S <sub>0</sub>	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
Blanko (tanpa ekstrak)	S <sub>1</sub>	0,7009	0,6959	0,6984	0,6295		
	S <sub>0</sub>	0,0684	0,0694	0,0689			
1% (33,6668 ppm)	S <sub>1</sub>	0,3008	0,3044	0,3026	0,26535	57,8475	26,4543
	S <sub>0</sub>	0,0349	0,0396	0,03725			
0,5% (16,8334 ppm)	S <sub>1</sub>	0,4291	0,4263	0,4277	0,38295	39,1660	
	S <sub>0</sub>	0,0476	0,0419	0,04475			
0,25% (8,4167 ppm)	S <sub>1</sub>	0,5107	0,5215	0,5161	0,4481	28,8165	
	S <sub>0</sub>	0,0688	0,0672	0,0680			
0,125% (4,2083 ppm)	S <sub>1</sub>	0,5813	0,5763	0,5788	0,5085	19,2216	
	S <sub>0</sub>	0,0701	0,0705	0,0703			
0,0625% (2,1042 ppm)	S <sub>1</sub>	0,6112	0,6127	0,6119	0,57255	14,6386	
	S <sub>0</sub>	0,0695	0,0797	0,0746			
0,03125% (1,0521 ppm)	S <sub>1</sub>	0,6519	0,6465	0,6492	0,56855	9,6823	
	S <sub>0</sub>	0,0801	0,0812	0,08065			
Persamaan regresi					$y = 12,6227 + 1,4129 x$ $r = 0,9835$		

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

**Tabel 4.9.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Etil Asetat  
Fraksi etil asetat yang ditimbang sebanyak 100,8 mg

Konsentrasi		Serapan (A)		Serapan rata-rata	S <sub>1</sub> -S <sub>0</sub>	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
Blanko (tanpa ekstrak)	S <sub>1</sub>	0,7028	0,7076	0,7052	0,6421		
	S <sub>0</sub>	0,0646	0,0616	0,0631			
0,5% (16,8 ppm)	S <sub>1</sub>	0,3827	0,3861	0,3844	0,3185	50,3971	15,4389
	S <sub>0</sub>	0,0643	0,0675	0,0659			
0,25% (8,4 ppm)	S <sub>1</sub>	0,4479	0,4409	0,4444	0,39215	38,9269	
	S <sub>0</sub>	0,0542	0,0503	0,05225			
0,125% (4,2 ppm)	S <sub>1</sub>	0,4963	0,4958	0,49605	0,458	28,6715	
	S <sub>0</sub>	0,0370	0,0391	0,03805			
0,0625% (2,1 ppm)	S <sub>1</sub>	0,5319	0,5328	0,53235	0,48735	24,1006	
	S <sub>0</sub>	0,0448	0,0452	0,045			
0,03125% (1,05 ppm)	S <sub>1</sub>	0,5616	0,5606	0,56105	0,51225	20,2227	
	S <sub>0</sub>	0,0482	0,0494	0,0488			
0,01563% (0,525 ppm)	S <sub>1</sub>	0,6177	0,6089	0,6133	0,5572	13,2222	
	S <sub>0</sub>	0,0553	0,0569	0,0561			
Persamaan regresi					$y = 17,7374 + 2,0897x$ $r = 0,9667$		

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

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

Fraksi metanol yang ditimbang sebanyak 100,5 mg

Konsentrasi		Serapan (A)		Serapan rata-rata	S <sub>1</sub> -S <sub>0</sub>	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
Blanko (tanpa ekstrak)	S <sub>1</sub>	0,7028	0,7076	0,7052	0,6421		
	S <sub>0</sub>	0,0646	0,0616	0,0631			
0,5% (16,75 ppm)	S <sub>1</sub>	0,2776	0,2867	0,28215	0,2402	62,5915	8,0434
	S <sub>0</sub>	0,0413	0,0426	0,04195			
0,25% (8,375 ppm)	S <sub>1</sub>	0,3502	0,3483	0,34925	0,3070	52,1865	
	S <sub>0</sub>	0,0403	0,0441	0,0422			
0,125% (4,1875 ppm)	S <sub>1</sub>	0,3804	0,3873	0,38385	0,3496	45,5537	
	S <sub>0</sub>	0,0336	0,0349	0,03425			
0,0625% (2,0938 ppm)	S <sub>1</sub>	0,4050	0,4022	0,4036	0,37105	42,2131	
	S <sub>0</sub>	0,0320	0,0331	0,03255			
0,03125% (1,0469 ppm)	S <sub>1</sub>	0,4457	0,4484	0,44705	0,4028	37,2683	
	S <sub>0</sub>	0,0437	0,0448	0,04425			
0,01563% (0,5235 ppm)	S <sub>1</sub>	0,4788	0,4655	0,47215	0,41225	35,7966	
	S <sub>0</sub>	0,0626	0,0572	0,0599			
Persamaan regresi					y = 37,1644 + 1,5958x r = 0,9826		

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

**Tabel 4.11.** Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Enzim Fraksi Metanol (Fraksi teraktif)

[S]	1/[S]		Serapan		Serapan rata-rata	U-K	1/V <sub>o</sub> (tanpa inhibitor)
			A1	A2			
10 Mm	0,1	U	0,6692	0,6737	0,67145	0,62165	1,6086
		K	0,0459	0,0537	0,0498		
5 mM	0,2	U	0,7006	0,6959	0,68005	0,6366	1,5708
		K	0,0432	0,0437	0,04345		
2,5 mM	0,4	U	0,6477	0,6492	0,64845	0,60635	1,6492
		K	0,0411	0,0431	0,0421		
1,25 mM	0,8	U	0,5985	0,5995	0,599	0,57915	1,7267
		K	0,0187	0,0210	0,01985		
1 mM	1	U	0,5789	0,5824	0,5807	0,5492	1,8208
		K	0,0322	0,0308	0,0315		

Keterangan: [S] = Konsentari substrat; A<sub>1</sub>= Serapan pertama; A<sub>2</sub>= Serapan kedua (duplo)

**Tabel 4.12.** Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Enzim Fraksi Metanol (lanjutan)

[S]	1/[S]		Serapan		Serapan rata-rata	U-K	1/V <sub>o</sub> (dengan inhibitor)
			A1	A2			
10 mM	0,1	U	0,6573	0,6587	0,658	0,6226	1,6062
		K	0,0333	0,0375	0,0354		
5 mM	0,2	U	0,4708	0,4692	0,47	0,4319	2,3154
		K	0,0384	0,0379	0,03815		
2,5 mM	0,4	U	0,3840	0,3831	0,3836	0,3525	2,8369
		K	0,0298	0,0324	0,0311		
1,25 mM	0,8	U	0,2969	0,2985	0,2977	0,2768	3,6127
		K	0,0208	0,0210	0,0209		
1 mM	1	U	0,2612	0,2646	0,2629	0,2499	4,0016
		K	0,0138	0,0122	0,0130		

Keterangan: [S] = Konsentari substrat; A<sub>1</sub>= Serapan pertama; A<sub>2</sub>= Serapan kedua (duplo)

**Tabel 4.13.** Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten Fraksi Metanol

	A	b	r	V <sub>max</sub>	K <sub>m</sub>
Tanpa inhibi-tor	1,5512	0,2480	0,9622	0,64	0,16
Dengan inhibi-tor	1,6547	2,4397	0,9775	0,60	1,47

**Tabel 4.14** Perbandingan eluen kromatografi kolom dan penggabungan fraksi hasil kolom.

No. Fraksi	Perbandingan eluen		Fraksi Gabungan
	Etil Asetat (mL)	Metanol (mL)	
1	200	0	Fraksi Gabungan I
2	195	5	
3	190	10	
4	185	15	Fraksi Gabungan II
5	180	20	
6	175	25	
7	170	30	Fraksi Gabungan III
8	165	35	
9	160	40	
10	150	50	
11	140	60	
12	130	70	Fraksi Gabungan IV
13	120	80	
14	110	90	
15	100	100	Fraksi Gabungan V
16	80	120	
17	60	140	Fraksi Gabungan VI
18	40	160	
19	20	180	
20	0	200	

**Tabel 4.15.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan I  
Fraksi yang ditimbang 54,42 mg

Konsentrasi (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	S <sub>1</sub> -S <sub>0</sub>	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
Blanko (tanpa ekstrak)	S <sub>1</sub>	0,7118	0,7114	0,7116	0,6503		
	S <sub>0</sub>	0,0625	0,06601	0,0613			
18,14	S <sub>1</sub>	0,273	0,286	0,2795	0,2394	63,19	13,2389
	S <sub>0</sub>	0,0395	0,0407	0,0401			
9,07	S <sub>1</sub>	0,4622	0,4634	0,4628	0,4008	38,37	
	S <sub>0</sub>	0,0621	0,0619	0,0620			
6,8	S <sub>1</sub>	0,4840	0,4847	0,4844	0,4256	34,56	
	S <sub>0</sub>	0,0584	0,0592	0,0588			
4,53	S <sub>1</sub>	0,5294	0,5284	0,5289	0,4678	28,06	
	S <sub>0</sub>	0,0618	0,0604	0,0611			
2,27	S <sub>1</sub>	0,5909	0,5905	0,6516	0,5309	18,36	
	S <sub>0</sub>	0,0590	0,0606	0,0598			
1,13	S <sub>1</sub>	0,6221	0,6210	0,6216	0,5613	13,69	
	S <sub>0</sub>	0,0595	0,0611	0,0603			
Persamaan regresi					$y = 2,7881x + 13,0887$ $r = 0,9933$		

**Tabel 4.16** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan II  
Fraksi yang ditimbang 34,74 mg

Konsentrasi (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	S <sub>1</sub> -S <sub>0</sub>	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
Blanko (tanpa ekstrak)	S <sub>1</sub>	0,7118	0,7114	0,7116	0,6503		
	S <sub>0</sub>	0,0625	0,06601	0,0613			
11,58	S <sub>1</sub>	0,3692	0,3684	0,3688	0,3174	51,19	11,3597
	S <sub>0</sub>	0,053	0,0498	0,0514			
8,69	S <sub>1</sub>	0,4464	0,4398	0,4431	0,3844	40,89	
	S <sub>0</sub>	0,0572	0,0602	0,0587			
5,79	S <sub>1</sub>	0,5227	0,5222	0,5225	0,4639	28,67	
	S <sub>0</sub>	0,0598	0,0574	0,0586			
2,89	S <sub>1</sub>	0,5471	0,5436	0,5454	0,4861	25,25	
	S <sub>0</sub>	0,0594	0,0592	0,0593			
1,45	S <sub>1</sub>	0,6088	0,6034	0,6061	0,5383	17,22	
	S <sub>0</sub>	0,0684	0,0672	0,0678			
0,72	S <sub>1</sub>	0,6429	0,6433	0,6431	0,5736	11,79	
	S <sub>0</sub>	0,0687	0,0703	0,0695			
Persamaan regresi					$y = 11,6655 + 3,3746x$ $r = 0,9874$		

**Tabel 4.17** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan III  
Fraksi yang ditimbang 102,1 mg

Konsentrasi (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	$S_1-S_0$	% Inhibisi	$IC_{50}$ (ppm)
		$A_1$	$A_2$				
Blanko (tanpa ekstrak)	$S_1$	0,7118	0,7114	0,7116	0,6503		
	$S_0$	0,0625	0,06601	0,0613			
34,03	$S_1$	0,3015	0,2921	0,2968	0,2472	61,89	25,8845
	$S_0$	0,0507	0,0485	0,0496			
25,53	$S_1$	0,3589	0,3619	0,3604	0,3093	52,44	
	$S_0$	0,0509	0,0513	0,0511			
17,02	$S_1$	0,5081	0,4996	0,5039	0,448	31,11	
	$S_0$	0,057	0,0548	0,0559			
8,51	$S_1$	0,5291	0,5287	0,5289	0,4712	27,54	
	$S_0$	0,0567	0,0587	0,0577			
4,25	$S_1$	0,6084	0,6089	0,6087	0,5481	15,72	
	$S_0$	0,0607	0,0605	0,0606			
2,13	$S_1$	0,6437	0,6420	0,6429	0,5747	11,63	
	$S_0$	0,0695	0,0669	0,0682			
Persamaan regresi					$y = 1,5599x + 9,6228$ $r = 0,9707$		

**Tabel 4.18** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan IV

Fraksi yang ditimbang 56,32 mg

Konsentrasi (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	S <sub>1</sub> -S <sub>0</sub>	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
Blanko (tanpa ekstrak)	S <sub>1</sub>	0,7118	0,7114	0,7116	0,6503		
	S <sub>0</sub>	0,0625	0,06601	0,0613			
18,77	S <sub>1</sub>	0,3229	0,3199	0,3214	0,2811	56,78	15,5620
	S <sub>0</sub>	0,042	0,0386	0,0403			
14,08	S <sub>1</sub>	0,3889	0,3875	0,3882	0,3374	48,12	
	S <sub>0</sub>	0,0529	0,0487	0,0508			
9,39	S <sub>1</sub>	0,5052	0,5054	0,5053	0,442	32,03	
	S <sub>0</sub>	0,0625	0,0641	0,0633			
4,69	S <sub>1</sub>	0,5471	0,5465	0,5468	0,4796	26,25	
	S <sub>0</sub>	0,0661	0,0683	0,0672			
2,35	S <sub>1</sub>	0,6300	0,6310	0,6305	0,5614	13,67	
	S <sub>0</sub>	0,0689	0,0693	0,0691			
1,17	S <sub>1</sub>	0,6648	0,6652	0,665	0,5927	8,86	
	S <sub>0</sub>	0,0745	0,0701	0,0723			
Persamaan regresi					$y = 2,6627x + 8,563$ $r = 0,974$		

**Tabel 4.19** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan V  
Fraksi yang ditimbang 24,19 mg

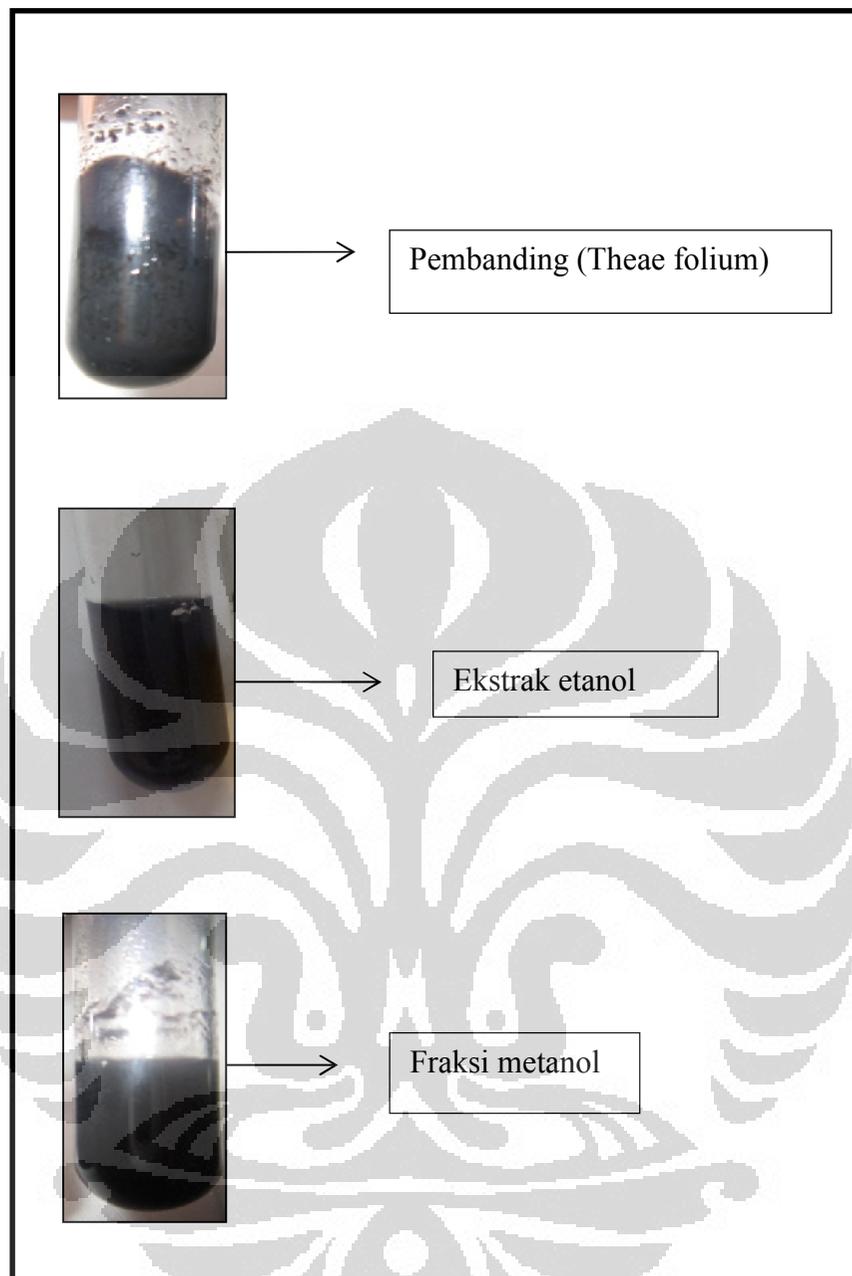
Konsentrasi (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	$S_1-S_0$	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
Blanko (tanpa ekstrak)	S <sub>1</sub>	0,7118	0,7114	0,7116	0,6503		
	S <sub>0</sub>	0,0625	0,06601	0,0613			
8,06	S <sub>1</sub>	0,3173	0,2999	0,3086	0,2688	58,67	7,2294
	S <sub>0</sub>	0,0403	0,0393	0,0398			
6,05	S <sub>1</sub>	0,4477	0,4401	0,4439	0,4018	38,22	
	S <sub>0</sub>	0,0430	0,0412	0,0421			
4,03	S <sub>1</sub>	0,4924	0,4934	0,4929	0,4627	28,85	
	S <sub>0</sub>	0,0395	0,0409	0,0402			
2,02	S <sub>1</sub>	0,5863	0,5881	0,5872	0,531	18,34	
	S <sub>0</sub>	0,0527	0,0597	0,0562			
1,01	S <sub>1</sub>	0,6429	0,6420	0,6425	0,5809	10,66	
	S <sub>0</sub>	0,0614	0,0616	0,0615			
0,5	S <sub>1</sub>	0,6655	0,6643	0,6649	0,5948	8,53	
	S <sub>0</sub>	0,0702	0,0700	0,0701			
Persamaan regresi					$y = 6,299x + 4,4618$ $r = 0,9813$		

**Tabel 4.20** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan VI  
Fraksi yang ditimbang 22,6 mg

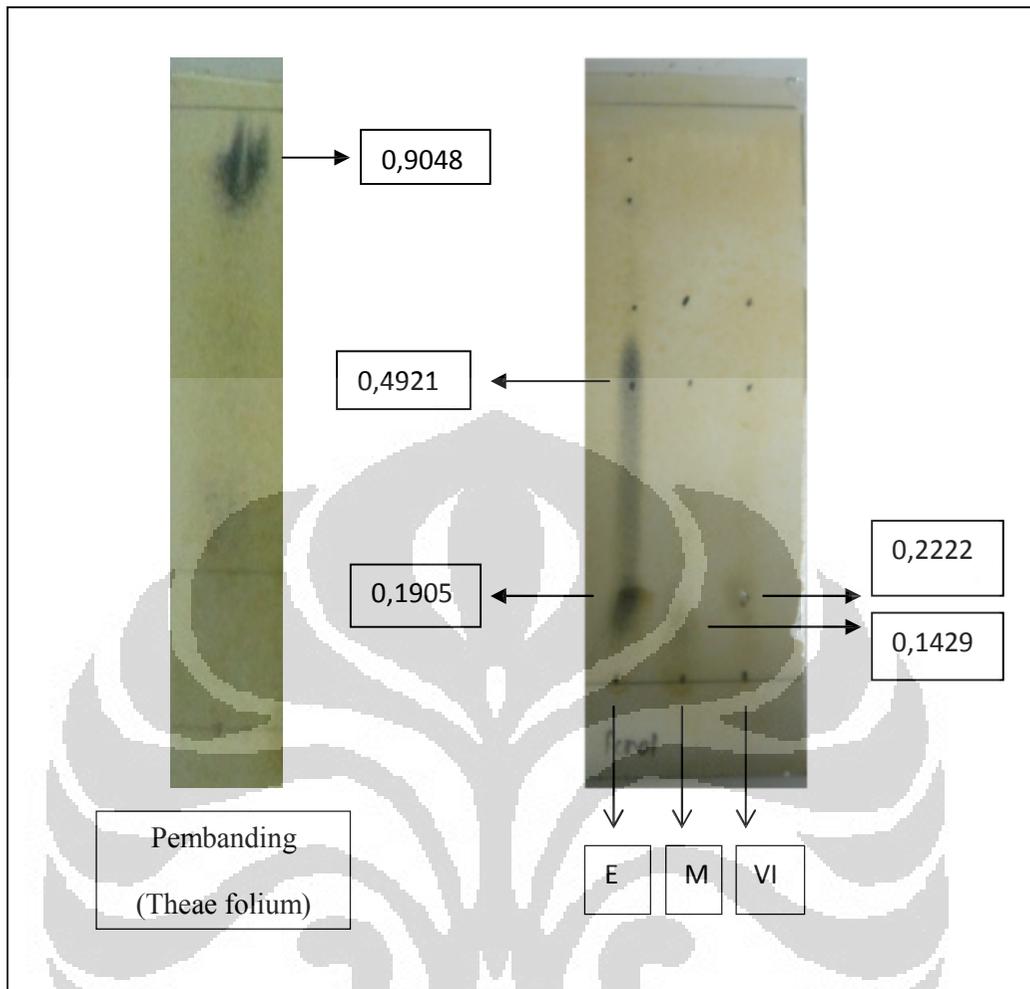
Konsentrasi (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	$S_1-S_0$	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
Blanko (tanpa ekstrak)	S <sub>1</sub>	0,7118	0,7114	0,7116	0,6503		
	S <sub>0</sub>	0,0625	0,06601	0,0613			
7,53	S <sub>1</sub>	0,2722	0,2756	0,2739	0,2326	64,23	4,7863
	S <sub>0</sub>	0,0409	0,0417	0,0413			
5,65	S <sub>1</sub>	0,3498	0,3546	0,3522	0,303	53,41	
	S <sub>0</sub>	0,0471	0,0513	0,0492			
3,89	S <sub>1</sub>	0,3950	0,3933	0,3942	0,3457	46,84	
	S <sub>0</sub>	0,0512	0,0458	0,0485			
2,83	S <sub>1</sub>	0,4410	0,4442	0,4426	0,3922	39,69	
	S <sub>0</sub>	0,0507	0,0501	0,0504			
1,88	S <sub>1</sub>	0,4736	0,4741	0,4739	0,4139	37,15	
	S <sub>0</sub>	0,0566	0,0634	0,06			
0,94	S <sub>1</sub>	0,5439	0,5446	0,5443	0,4744	27,03	
	S <sub>0</sub>	0,0693	0,0705	0,0699			
Persamaan regresi					$y = 5,2734x + 24,76$ $r = 0,9801$		

**Tabel 4.21.** Hasil Identifikasi Golongan Senyawa Kimia

Golongan Senyawa Kimia	Ekstrak		
	Etanol	metanol	Fraksi Gabungan VI
Alkaloid	-	-	-
Flavonoid	+	+	+
Tanin	+	+	-
Saponin	+	+	-
Terpenoid	-	-	-
Gula	+	+	+
Kuinon	-	-	-

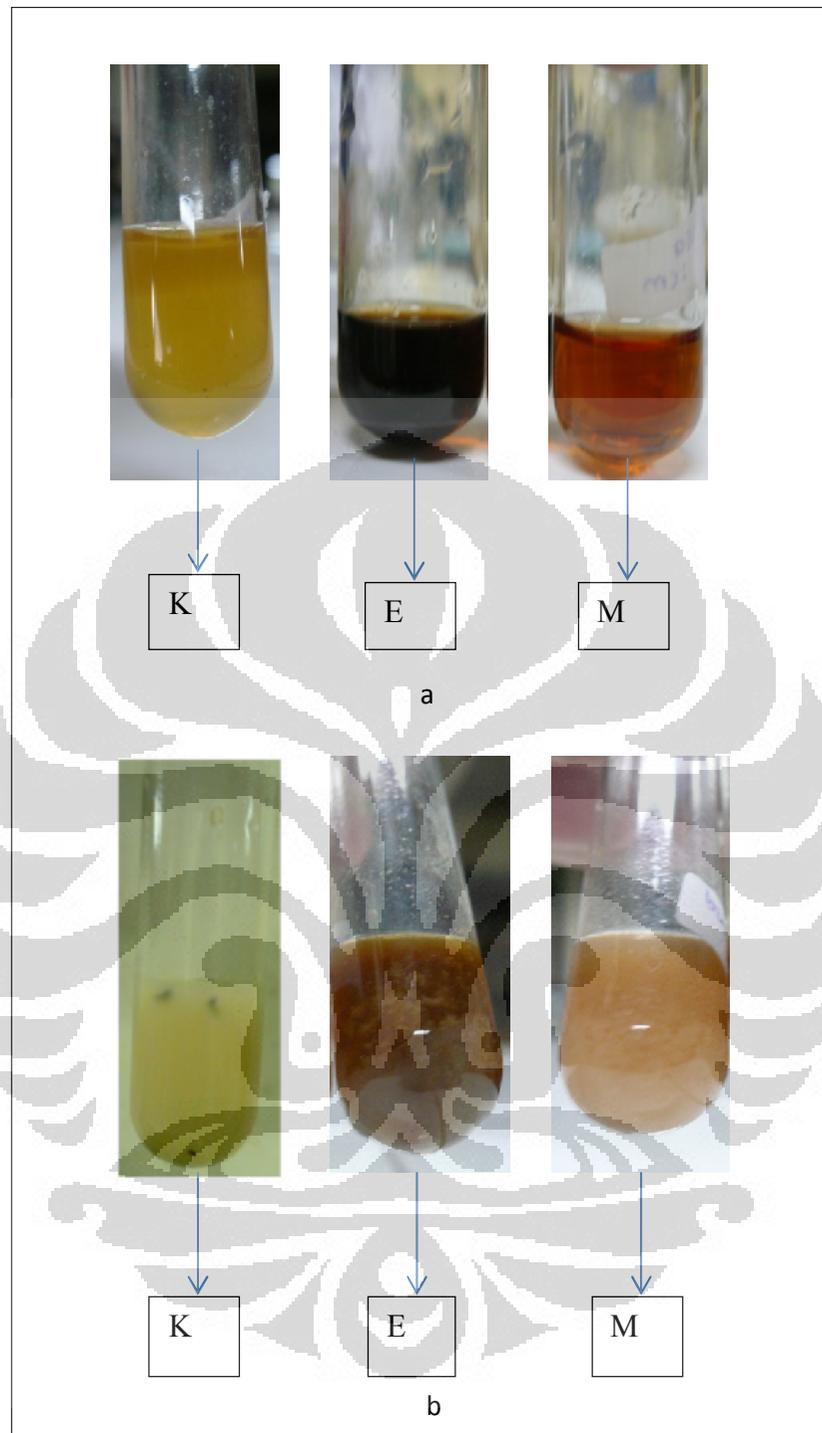


Gambar 4.6 Identifikasi Fenol dengan  $\text{FeCl}_3$ .



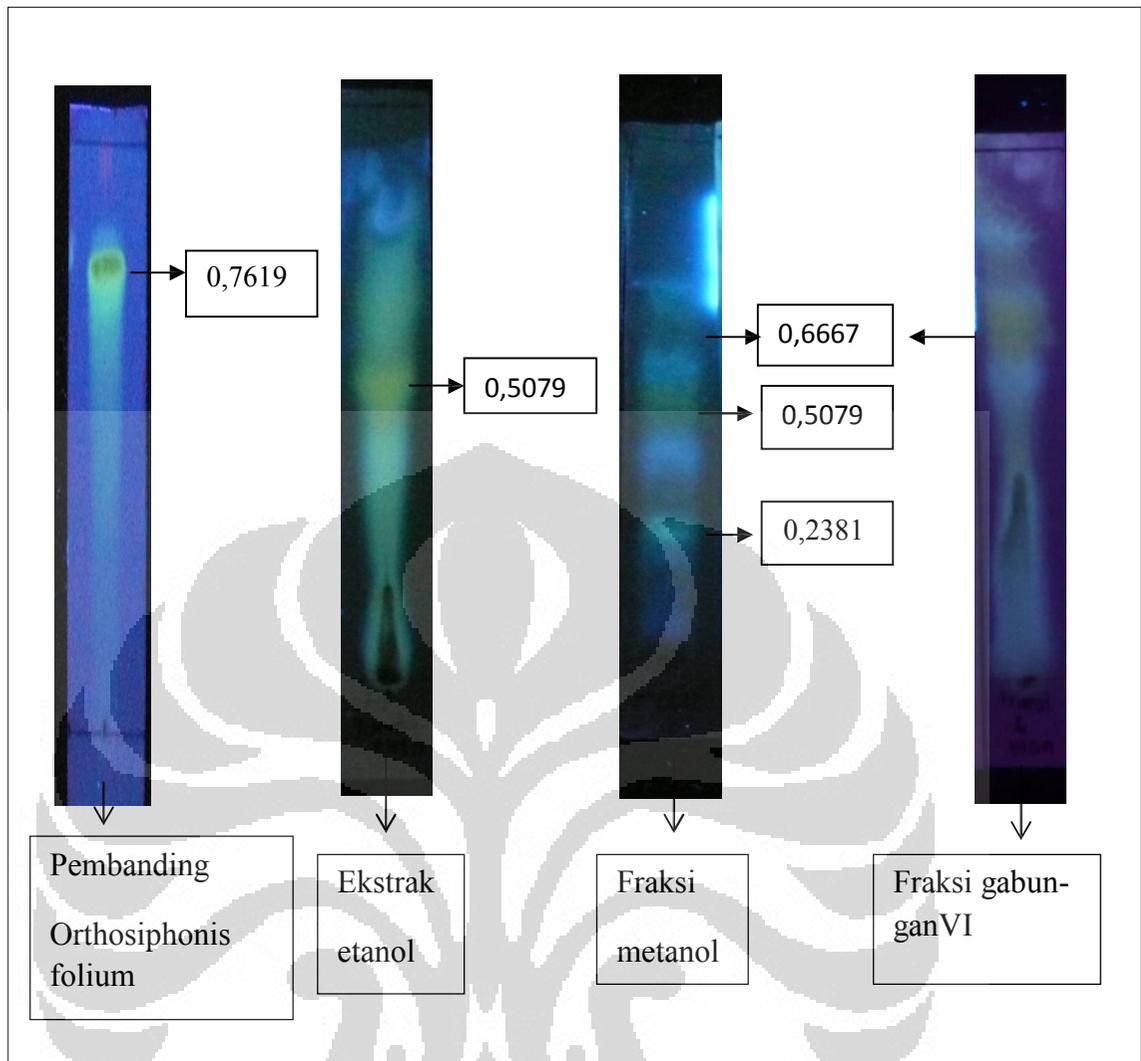
Keterangan : E : Ekstrak etanol; M: Fraksi metanol; VI : Fraksi gabungan VI.

**Gambar 4.7** Identifikasi Fenol secara KLT menggunakan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak butanol : asam asetat : air (4:1:5) setelah disemprot FeCl<sub>3</sub>.

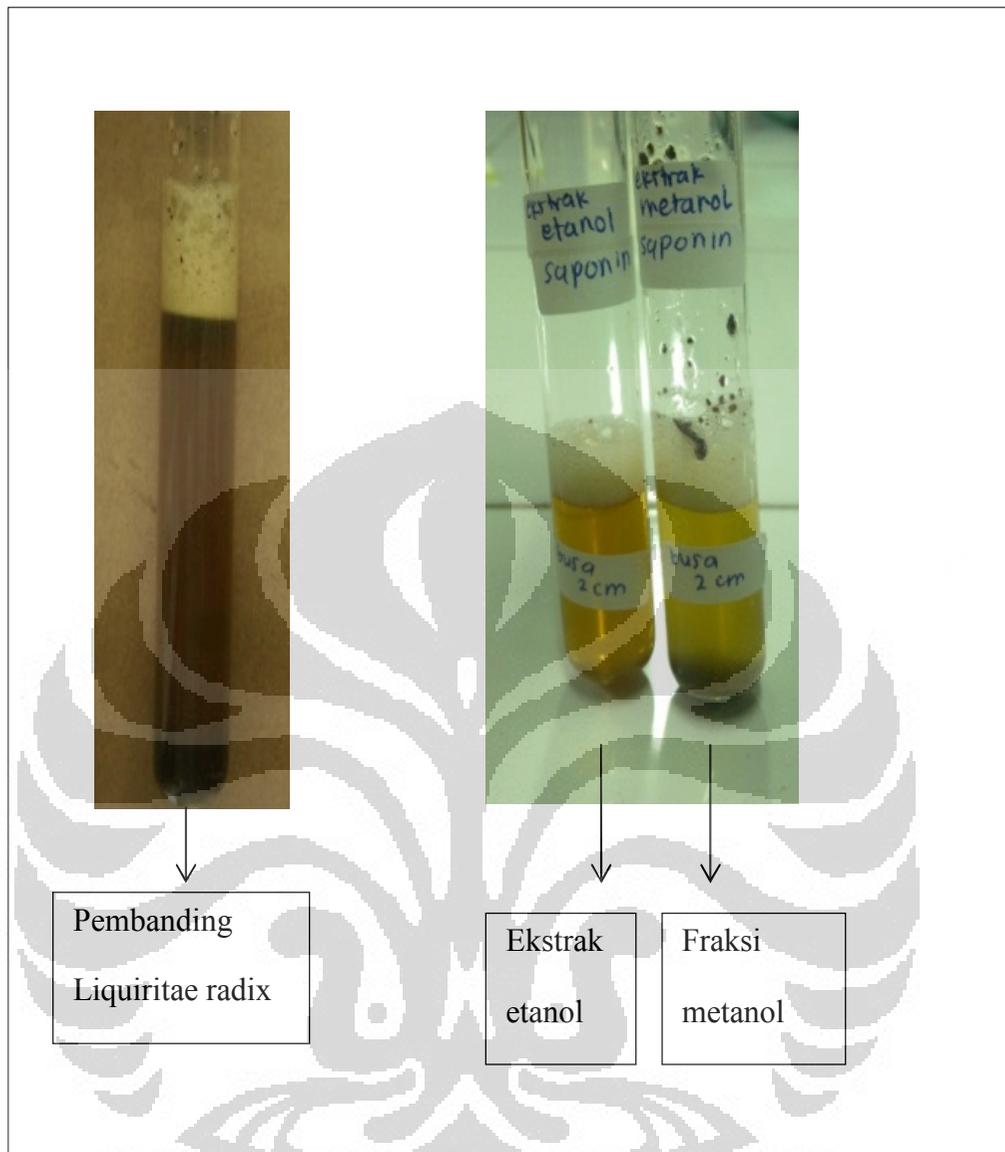


Keterangan : K : Pemanding (*Theae folium*); E : Ekstrak etanol; M: Fraksi metanol.

**Gambar 4.8** Identifikasi Tanin dengan gelatin. (a) Sebelum ditetes gelatin; (b) Setelah ditetes gelatin.



**Gambar 4.9** Identifikasi Flavonoid secara KLT dilihat dibawah sinar UV 366 nm setelah disemprot  $\text{AlCl}_3$ . Fase diam yang digunakan adalah silika gel  $\text{GF}_{254}$  dan fase geraknya butanol : asam asetat : air (4:1:5).



**Gambar 4.10** Identifikasi Saponin setelah penambahan HCl 2N

**Lampiran 1.** Perhitungan Unit Larutan  $\alpha$ -glukosidase dan pengencerannya.

**Data yang tertera pada kemasan  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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.

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

Dikarenakan 0,03 mg terlalu kecil untuk ditimbang menggunakan timbangan analitik yang memiliki kemampuan menimbang minimum 10,0 mg, dilakukan penimbangan 10,1 mg serbuk enzim dengan perhitungan unit sebagai berikut.

**Penimbangan enzim untuk pengujian sejumlah 10,1 mg serbuk enzim**

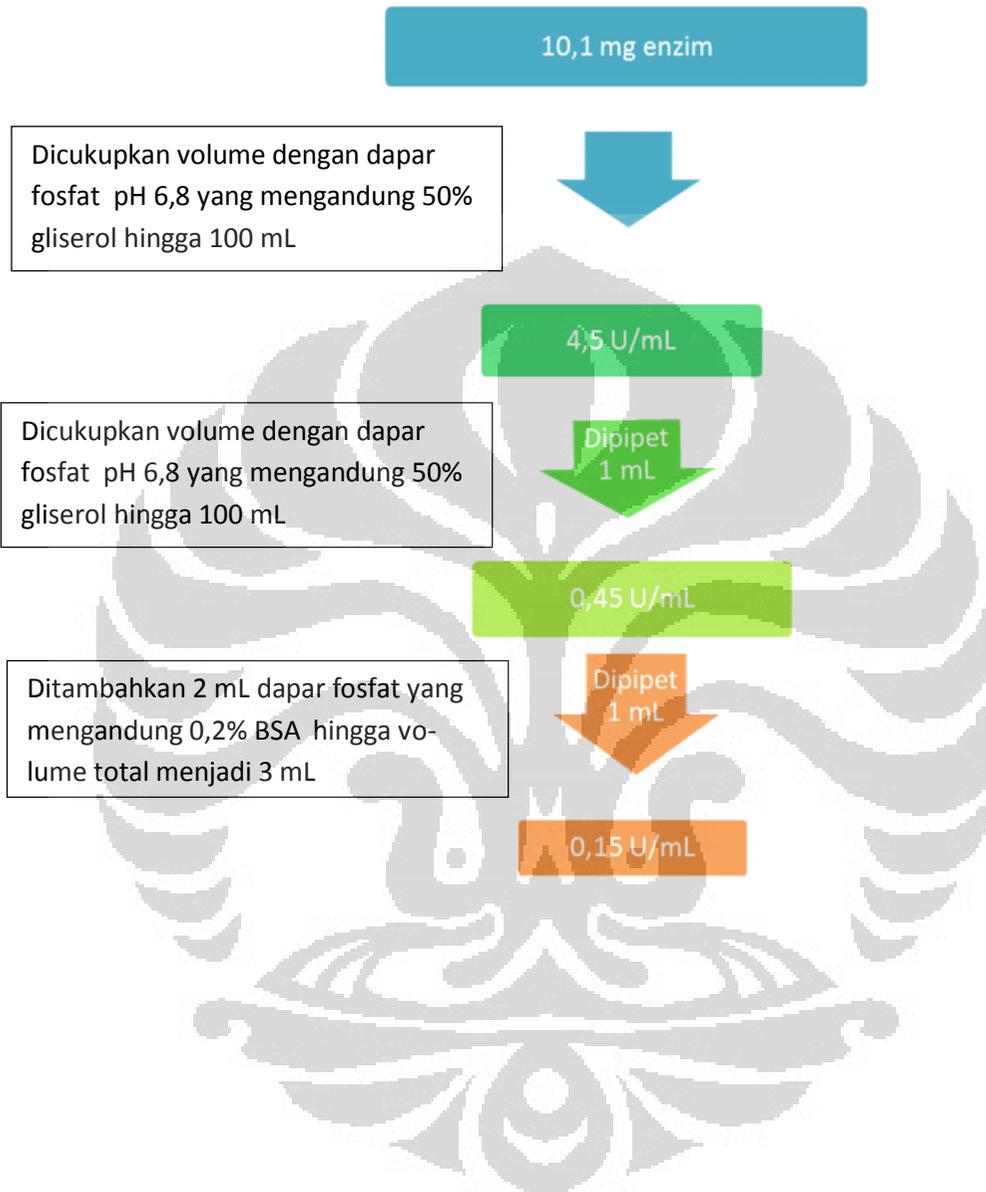
$$\frac{10,1 \text{ mg serbuk}}{3,85 \text{ mg serbuk}} \times 179 \text{ Unit} = 469,58 \text{ Unit}$$

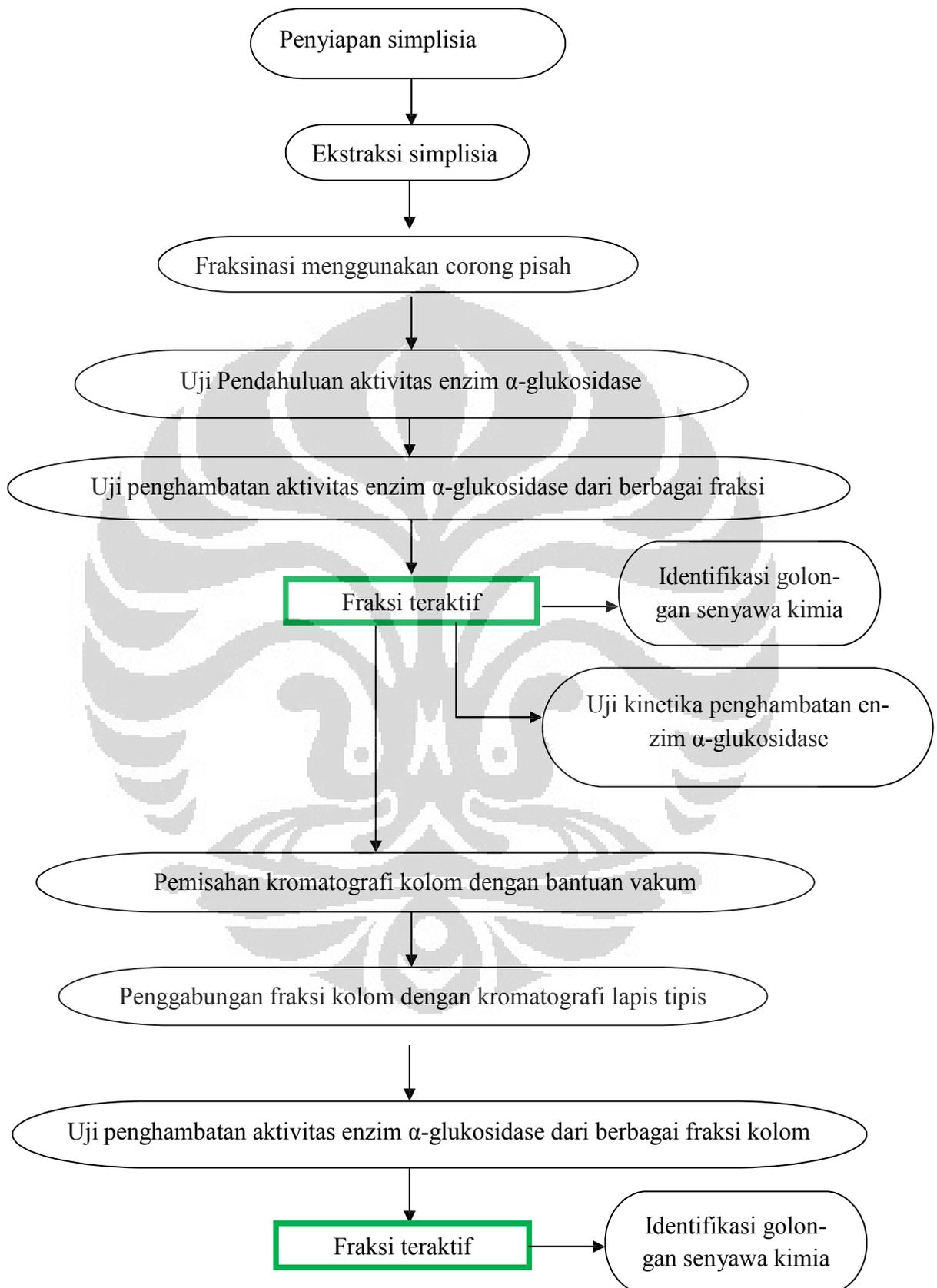
$$\frac{469,58 \text{ Unit}}{100 \text{ mL}} = 4,6958 \text{ Unit / mL}$$

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

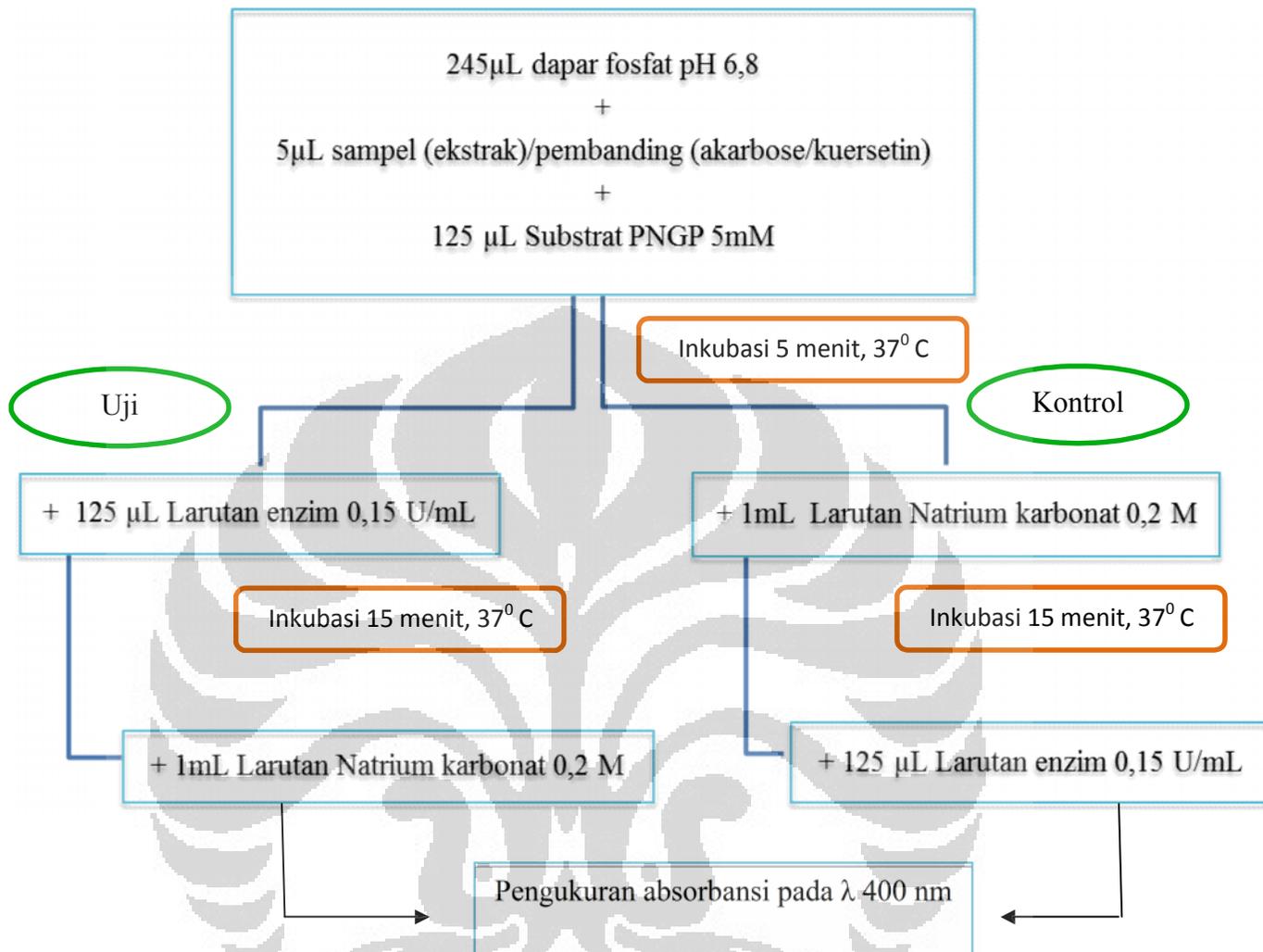
(Lanjutan)

**Pengenceran dilakukan sebanyak 2 kali untuk memperoleh 0,15 U/mL dengan langkah kerja berikut :**

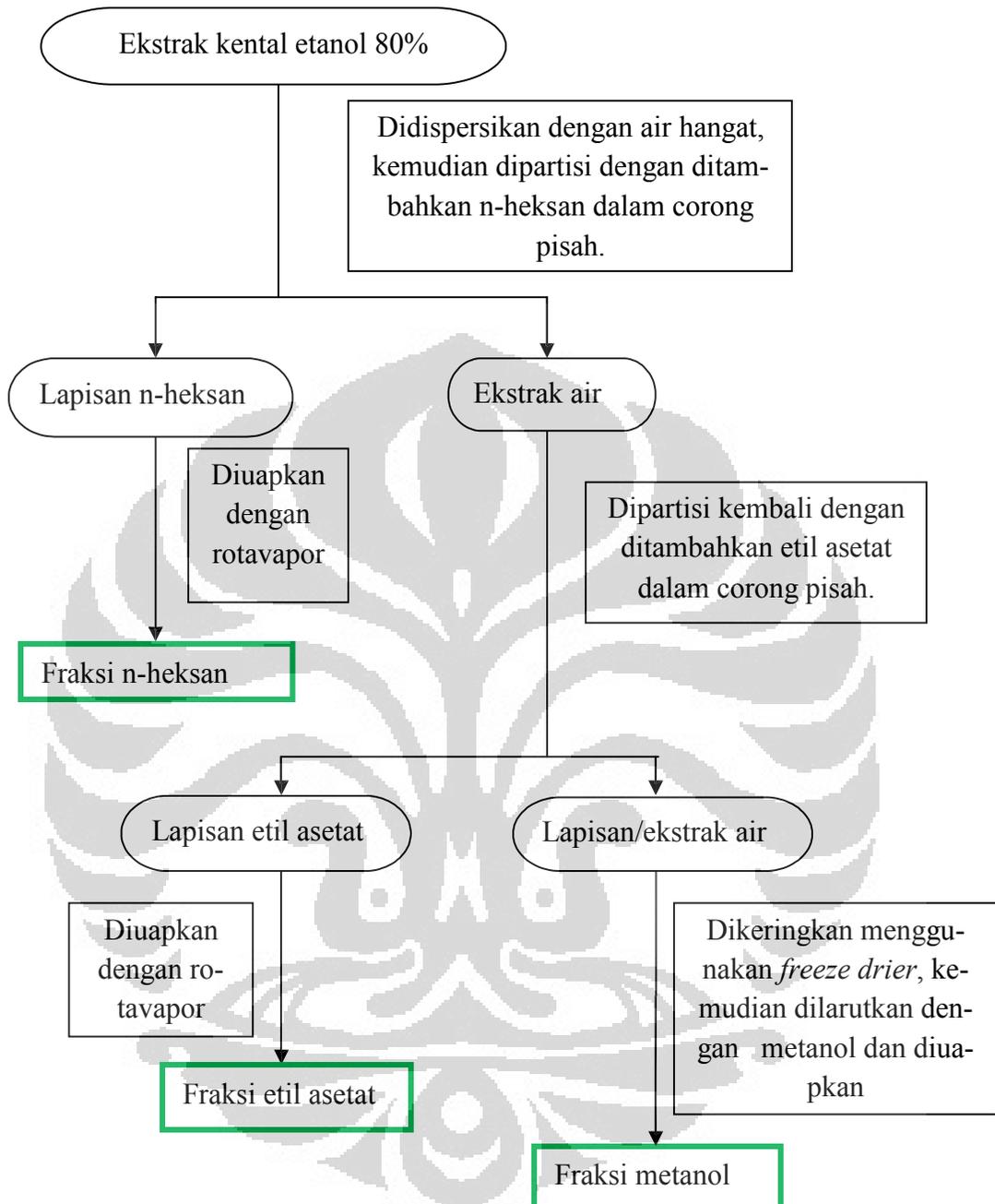


**Lampiran 2. Skema Prosedur Kerja**

**Lampiran 3.** Skema Tahap Uji Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -glukosidase



**Lampiran 4.** Skema Fraksinasi Partisi Cair-cair.



## Lampiran 5. Surat Determinasi Tanaman



**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA  
( Indonesian Institute of Sciences )  
PUSAT KONSERVASI TUMBUHAN - KEBUN RAYA BOGOR  
( Center for Plant Conservation - Bogor Botanical Gardens )**

Jalan Ir. H. Juanda No. 13, P.O. BOX 309 Bogor 16003, Indonesia  
Telepon (0251) 8322187 - 8321657 - 8322220 - 8311362, 8352519, Fax. 82 (251) 8322187, 8313985  
e-mail : kribli@indosat.net.id

Bogor, 24 Maret 2012

No. : 266 /IPH.3.02/KS/III/2012  
Lampiran : -  
Hal : Keterangan determinasi

Kepada Yth. :  
Sdri. Bianca Loranza  
NPM. 0306397995  
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 daun *Antidesma bunius* (L.) Spreng., yang merupakan anggota Suku Euphorbiaceae.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

.....  
a.n. KEPALA  
Kepala Bidang Konservasi Ex-situ



Dr. Joko Ridha Witano  
NIP. 197010091994031004

Lampiran 6. Sertifikat Analisis  $\alpha$ -Glukosidase.

# Certificate of Analysis

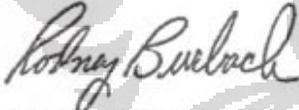
SIGMA-ALDRICH

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

TEST	SPECIFICATION	LOT 129K1425 RESULTS
% 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.	
<b>Recommended Retest Period</b>	4 years	
<b>Specification Date:</b>	APR 2009	
<b>Date of QC Release:</b>	JAN 2010	
<b>Recommended Retest Date:</b>	DEC 2013	
<b>Print Date:</b>	JAN 25 2010	



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

1/2

Lampiran 7. Sertifikat Analisis Substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida.

SIGMA-ALDRICH

SIGMA

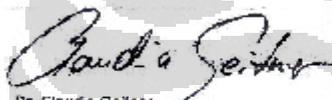
Inno-Parkstrasse 26, CH-9411, Buchs (SG), Switzerland  
Tel: +41 01 735 2011 Fax: +41 01 735 6449

## Certificate of Analysis

Product Name: 4-NITROPHENYL  $\alpha$ -D-GLUCOPYRANOSIDE  
 >= 99 %  
 Product Number: N1377  
 Product Brand: Sigma  
 Molecular Formula:  $C_{12}H_{13}NO_6$   
 Molecular Mass: 301.25  
 CAS Number: 3767-28-0

TEST	SPECIFICATION	LOT BCBG2931V RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF-WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (TLC AREA %)	≥99 %	99.0 %
SPECIFIC ROTATION (20/D)	210 - 220 DEGREES	210.4 DEGREES
CONCENTRATION	C=1 IN WATER	C=1 IN WATER
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS TO YELLOW-GREEN	VERY FAINT YELLOW-GREEN
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR TO VERY SLIGHTLY HAZY	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	20 MG/ML IN METHANOL	20 MG/ML IN METHANOL

QC RELEASE DATE 09/AUG/11  
 RECOMMENDED RETEST DATE JUL/16



Dr. Claudia Geffner  
 Manager Quality Control  
 Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that its products conform to the information contained in its literature other Sigma-Aldrich publications. Further, Sigma-Aldrich warrants the suitability of the material for its particular use. See reverse side of boxes for additional terms and conditions of sale. The release given on the Certificate of Analysis shall be the results determined at the time of analysis.

### Lampiran 8. Skema Ringkasan Kerja

