

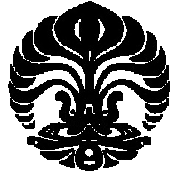
**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIDIABETES DENGAN METODE  
PENGHAMBATAN ENZIM ALFA-GLUKOSIDASE DAN PENAPISAN  
FITOKIMIA DARI FRAKSI TERAKTIF KULIT BATANG BUNI  
(*Antidesma bunius* L.)**

**SKRIPSI**

**PURWA INDAH SEPTI MAHANANI  
0806398581**

**DEPARTEMEN FARMASI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPOK  
JULI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIDIABETES DENGAN METODE  
PENGHAMBATAN ENZIM ALFA-GLUKOSIDASE DAN PENAPISAN  
FITOKIMIA DARI FRAKSI TERAKTIF KULIT BATANG BUNI  
(*Antidesma bunius* L.)**

**SKRIPSI**

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

**PURWA INDAH SEPTI MAHANANI  
0806398581**

**DEPARTEMEN FARMASI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
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 plagiarism, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 9 Juli 2012

Tanda Tangan dan  
Nama Lengkap



Purwa Indah Septi Mahanani

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Purwa Indah Septi Mahanani

NPM : 0806398581

Tanda Tangan : 

Tanggal : 9 Juli 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Purwa Indah Septi Mahanani  
NPM : 0806398581  
Program Studi : Farmasi  
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Antidiabetes dengan Metode Penghambatan Enzim Alfa-Glukosidase dan Penapisan Fitokimia dari Fraksi Teraktif Kulit Batang 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 Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

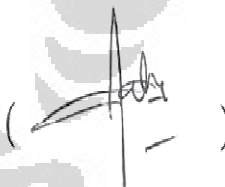
Pembimbing I : Dr. Berna Elya, Apt., M.Si.

()

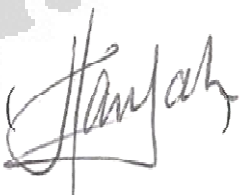
Pembimbing II : Dr. Amarila Malik, Apt., M.Si.

()

Penguji I : Dr. Katrin, M.S.

()

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

()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 9 Juli 2012

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur hanya kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

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

1. Ibu Dr. Berna Elya, Apt., M.Si., selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
2. Ibu Dr. Amarila Malik, Apt., M.Si., selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
3. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
4. Ibu Prof. Dr. Endang Hanani, Apt., M.S., selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;
5. Orang tua dan adik yang senantiasa memberikan dukungan dan doa demi kelancaran studi penulis;
6. Pihak Kebun Raya Bogor dan LIPI yang telah membantu dalam pengadaan bahan baku tanaman serta determinasi tanaman;
7. Pihak PT. Dixa Medica yang telah membantu dalam pengadaan bahan baku akarbose;

8. Sahabat seperjuangan, Bianca dan Febriyanti, yang senantiasa memberikan semangat untuk segera menyelesaikan penelitian ini;
9. Wardah, Pihaniar, Kartika F. N., Ade, sahabat seperjuangan di laboratorium fitokimia, laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi, yang senantiasa memberikan semangat, dukungan, dan doa.
10. Kak Ahmad senjaya, kak Ary, kak Kun, kak Wulan, kak Anas, kak Riza, Devi, kak Ayuti, dan kak Silvi, serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

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

Penulis

2012

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

---

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

Nama : Purwa Indah Septi Mahanani  
NPM : 0806398581  
Program Studi : Sarjana  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

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

Uji Aktivitas Antidiabetes dengan Metode Penghambatan Enzim Alfa-Glukosidase dan Penapisan Fitokimia dari Fraksi Teraktif Kulit Batang 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 : 9 Juli 2012

Yang menyatakan



(Purwa Indah Septi Mahanani)



## ABSTRAK

Nama : Purwa Indah Septi Mahanani  
Program Studi : Farmasi  
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Antidiabetes dengan Metode Penghambatan Enzim Alfa-Glukosidase dan Penapisan Fitokimia dari Fraksi Teraktif Kulit Batang Buni (*Antidesma bunius* L.)

Inhibitor  $\alpha$ -glukosidase telah dikenal sebagai agen terapeutik untuk pengobatan diabetes, terutama DM tipe 2. Telah diketahui bahwa banyak bahan tanaman memiliki efek penghambatan  $\alpha$ -glukosidase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi dari ekstrak kulit batang buni yang memiliki aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase tertinggi dan untuk mengidentifikasi golongan senyawa yang terkandung pada fraksi teraktif. Serbuk simplisia diekstraksi secara refluks menggunakan pelarut etanol 80% kemudian difraksinasi dengan n-heksana, etil asetat, dan metanol. Pengujian aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dilakukan dengan mengukur pelepasan p-nitrofenol pada 400 nm. Hasil uji menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas inhibisi tertinggi dengan  $IC_{50}$  5,73 ppm. Kinetika enzim menunjukkan fraksi etil asetat menghambat  $\alpha$ -glukosidase secara kompetitif. Hasil identifikasi golongan senyawa menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mengandung gula, terpen, dan flavonoid. Fraksi etil asetat difraksinasi kembali menggunakan kromatografi cair vakum sehingga didapatkan 10 fraksi yang digabungkan berdasarkan profil KLT. Hasil uji menunjukkan fraksi G (fraksi etil asetat : metanol (180:20)) adalah fraksi teraktif dengan  $IC_{50}$  1,16 ppm dan penapisan fitokimia mengindikasikan adanya gula dan flavonoid.

Kata Kunci :  $\alpha$ -glukosidase, *Antidesma bunius* L., kulit batang buni.  
xvi+100 halaman : 12 gambar; 35 tabel; 10 lampiran  
Daftar Pustaka : 57 (1966-2012)

## ABSTRACT

Name : Purwa Indah Septi Mahanani  
Program study : S1 Pharmacy  
Title : Antidiabetic Activity Test by Inhibition of  $\alpha$ -Glucosidase Enzyme Activity Method and Phytochemical Screening from the Most Active Fraction of Buni (*Antidesma bunius* L.) Stem Bark.

$\alpha$ -Glucosidase inhibitors have known to be therapeutic agent for diabetes treatment, especially type 2 DM. It has been recognized that many plant materials have inhibitory effect of  $\alpha$ -glucosidase. This research aimed to get the fraction from Buni stem barks extract which had the highest  $\alpha$ -glucosidase inhibiting activity and followed by phytochemical screening from the most active fraction. Simplisia powder was extracted by reflux using 80% ethanol then fractionated using n-hexane, ethyl acetate, and methanol. Inhibitory activity test was performed by measuring the p-nitrophenol at 400 nm. The result showed that ethyl acetate fraction have the highest  $\alpha$ -glucosidase inhibiting activity with  $IC_{50}$  values 5.73 ppm. Enzyme kinetics showed that ethyl acetate fraction inhibited competitively. Phytochemical screening showed that ethyl acetate fraction of Buni stem barks contained sugars, terpenes, and flavonoids. Ethyl acetate extract was fractionated using vacuum liquid chromatography and obtained ten fractions combined based on TLC profiles. The result showed that G fraction (ethyl acetate:methanol (180:20) fraction) is the most active with  $IC_{50}$  values 1.16 ppm and phytochemical screening indicated the presence of sugars, and flavonoids.

Key Words :  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, *Antidesma bunius* L., Buni stem barks.  
xvi + 100 pages : 12 pictures; 35 tables; 10 appendices  
Bibliography : 57 (1966-2012)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	viii
ABSTRAK.....	ix
ABSTACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	2
1.3. Manfaat Penelitian.....	2
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Diabetes Melitus.....	4
2.1.1 Definisi & Klasifikasi.....	5
2.1.2 Terapi Diabetes Melitus.....	4
2.2. Enzim $\alpha$ -glukosidase dan penghambat $\alpha$ -glukosidase.....	8
2.3. <i>Antidesma bunius</i> L.....	10
2.3.1 Klasifikasi tanaman buni.....	10
2.3.2 Morfologi.....	10
2.3.3 Ekologi, penyebaran dan budidaya.....	11
2.3.4 Kandungan Kimia.....	11
2.3.5 Manfaat.....	11
2.4. Simplisia.....	12
2.5. Ekstraksi dan Ekstrak.....	12
2.5.1 Cara Dingin.....	13
2.5.2 Cara Panas.....	13
2.6. Enzim.....	14
2.6.1 Karakter Enzim.....	14
2.6.2 Penghambatan Aktivitas Enzim.....	15
2.6.3 Uji Penghambatan Aktivitas Enzim $\alpha$ -Glukosidase.....	15
2.6.4 Penentuan Kinetika Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase.....	16
2.7. Spektrofotometri UV-Vis.....	18
2.8. Pola Kromatogram, Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Kolom, serta Penapisan Fitokimia Fraksi Aktif ....	19
2.8.1 Pola Kromatogram.....	19
2.8.2 Kromatografi Lapis Tipis.....	20
2.8.3 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom.....	21
2.8.4 Penapisan Fitokimia.....	21

<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>24</b>
3.1. Waktu dan tempat .....	24
3.2. Bahan .....	24
3.3. Alat .....	24
3.3.1 Bahan Uji .....	24
3.3.2 Bahan Kimia.....	24
3.4. Prosedur Pelaksanaan .....	25
3.4.1 Penyiapan Bahan Uji.....	25
3.4.2 Ekstraksi.....	31
3.4.3 Fraksinasi .....	31
3.4.4 Uji Pendahuluan Aktivitas Enzim $\alpha$ -Glukosidase.....	32
3.4.5 Perhitungan Aktivitas Enzim .....	35
3.4.6 Penentuan Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase.....	36
3.4.7 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom.....	38
3.4.8 Penentuan Kinetika Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase.....	40
3.4.9 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia .....	41
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>44</b>
4.1. Penyiapan bahan uji .....	44
4.2. Ekstraksi simplisia .....	45
4.3. Fraksinasi .....	46
4.4. Uji pendahuluan aktivitas $\alpha$ -glukosidase .....	46
4.4.1 Penetapan Panjang Gelombang p-Nitrofenol.....	46
4.4.2 Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Konsentrasi Substrat PNPG .....	47
4.4.3 Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi pH.....	49
4.4.4 Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Suhu.....	50
4.5. Uji aktivitas penghambatan enzim $\alpha$ -glukosidase .....	51
4.6. Pemisahan dengan Kromatografi Kolom.....	53
4.7. Uji Aktivitas Penghambatan dari Fraksi Kolom.....	54
4.8. Penentuan kinetika penghambatan enzim $\alpha$ -glukosidase.....	54
4.9. Penapisan Fitokimia.....	55
4.9.1 Alkaloid.....	56
4.9.2 Gula.....	56
4.9.3 Favonoid.....	56
4.9.4 Terpen .....	57
4.9.5 Tanin .....	57
4.9.6 Saponin.....	57
4.9.7 Antrakuinon .....	57
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>58</b>
5.1. Kesimpulan .....	58
5.2. Saran .....	58
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>59</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Struktur kimia akarbose .....	9
Gambar 2.2.	Gambar Tanaman (a), Daun (b), dan Batang (c) <i>Antidesma bunius</i> L.	10
Gambar 2.3.	Reaksi enzimatis $\alpha$ -glukosidase dan p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranos.....	16
Gambar 2.4.	Plot resiprokal-ganda atau Lineweaver-Burk digunakan untuk mengevaluasi Nilai $K_m$ dan $V_{max}$ .....	17
Gambar 2.5.	Plot Resiprokal-Ganda atau Lineweaver-Burk Inhibisi Kompetitif dan Nonkompetitif.....	18
Gambar 4.1.	Spektrum Serapan p-Nitrofenol dengan Unit Larutan Enzim 0,15 U/mL; Konsentrasi Substrat 10 mM; pH 6,8; dan suhu 37 <sup>0</sup> C.....	47
Gambar 4.2.	Kurva optimasi aktivitas enzim dengan variasi konsentrasi Substrat PNPG 1 hingga 30 mM.....	49
Gambar 4.3.	Kurva optimasi aktivitas enzim dengan variasi pH 6,6; 6,8; dan 7,0 .....	50
Gambar 4.4.	Kurva optimasi aktivitas enzim dengan variasi suhu 30, 37, dan 40 <sup>0</sup> C .....	51
Gambar 4.5.	Grafik kinetika inhibisi enzim $\alpha$ -glukosidase pada fraksi etil asetat 0,25% (8,375 ppm).....	55
Gambar 4.6.	Kromatogram Flavonoid Ekstrak Etanol 80%, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi G Kulit Batang Buni dengan Eluen Kloroform : Metanol (17:3) disemprot dengan Penampak Bercak AlCl <sub>3</sub> 0,5%.....	65
Gambar 4.7.	Kromatogram Terpen Ekstrak Etanol 80%, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi G Kulit Batang Buni dengan Eluen n-Heksana : Etil Asetat (9:1) disemprot dengan Penampak Bercak Vanilin–Asam Sulfat.....	66

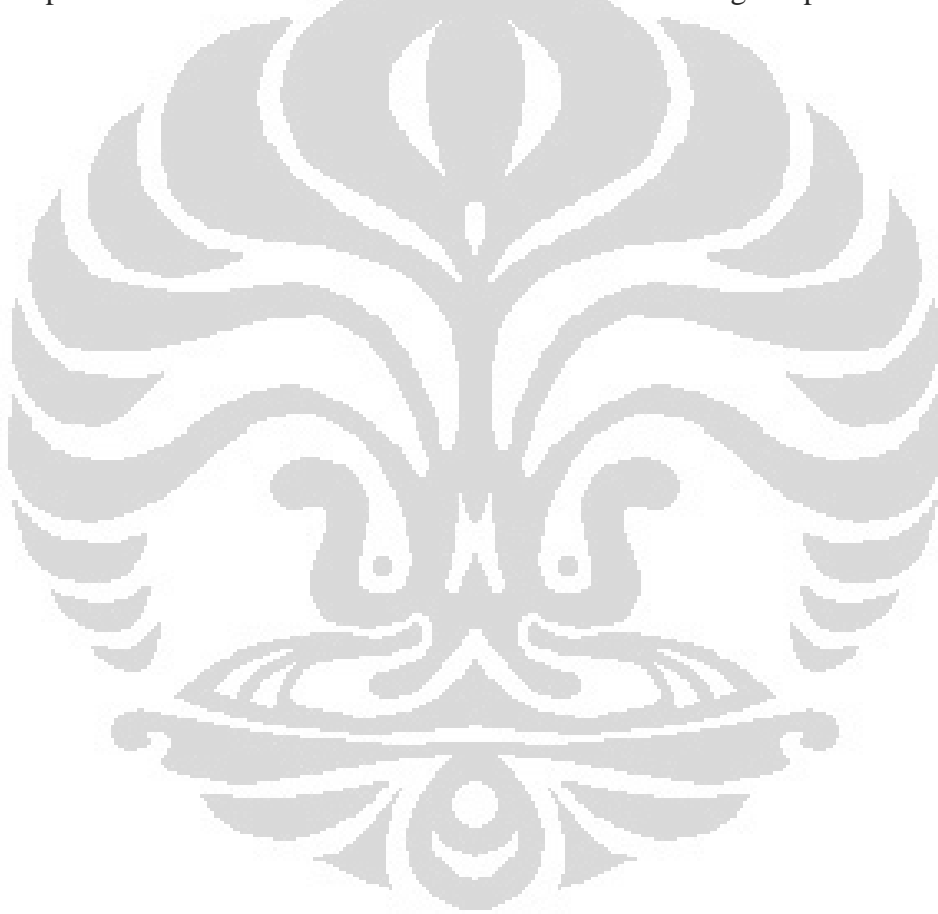
## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Kriteria berdasarkan kadar glukosa darah.....	4
Tabel 2.2	Zat Penyerap untuk Kromatografi Lapisan Tipis .....	20
Tabel 3.1	Penentuan panjang gelombang p-nitrofenol .....	32
Tabel 3.2	Prosedur Optimasi Konsentrasi Substrat PNPG dengan volum total 1,5 mL .....	33
Tabel 3.3	Prosedur Optimasi pH dengan volume total masing-masing 1,5 mL.....	34
Tabel 3.4	Prosedur Optimasi Suhu Inkubasi dengan volume total masing-masing 1,5 mL.....	35
Tabel 3.5	Prosedur Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase dengan volume total masing-masing 1,5 mL.....	38
Tabel 3.6	Perbandingan Eluen Kromatografi Kolom.....	39
Tabel 3.7	Prosedur Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim dengan volume total masing-masing 1,5 mL.....	41
Tabel 4.1	Persentase Penyusutan Bobot Simplisia Kulit Batang Buni setelah Pengeringan.....	67
Tabel 4.2	Rendemen ekstrak etanol 80% kulit batang buni .....	67
Tabel 4.3	Rendemen fraksi hasil fraksinasi cair-cair terhadap bobot ekstrak etanol 80% 128,8 g.....	67
Tabel 4.4	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Konsentrasi Substrat 1; 2; 2,5; 5; 10; 15; 20; dan 30 mM dengan Unit Larutan Enzim 0,15 U/mL, Suhu Inkubasi 37 <sup>0</sup> C, dan pH 6,8.....	68
Tabel 4.5	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi pH Dapar Fosfat 6,6; 6,8; dan 7,0 dengan Unit Larutan Enzim 0,15 U/mL, Suhu Inkubasi 37 <sup>0</sup> C, dan Konsentrasi Substrat 5 mM.....	69
Tabel 4.6	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Suhu Inkubasi 30; 37; dan 40 <sup>0</sup> C dengan Unit Larutan Enzim 0,15 U/mL, Konsentrasi Substrat 5 mM dan pH 6,8.....	70
Tabel 4.7	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Akarbose (sebagai Pembanding I).....	71
Tabel 4.8	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Kuersetin (sebagai Pembanding II).....	72
Tabel 4.9	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi n-Heksana.....	73
Tabel 4.10	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Etil Asetat.....	74
Tabel 4.11	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Metanol.....	75
Tabel 4.12	Penggabungan Fraksi Kolom Berdasarkan Pola Kromatogram KLT.....	76
Tabel 4.13	Rendemen fraksi kolom gabungan terhadap ekstrak etil asetat 5,4 g.....	78

Tabel 4.14	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan A.....	79
Tabel 4.15	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan B.....	80
Tabel 4.16	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan C.....	81
Tabel 4.17	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan D.....	82
Tabel 4.18	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan E.....	83
Tabel 4.19	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan F.....	84
Tabel 4.20	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan G.....	85
Tabel 4.21	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan H.....	86
Tabel 4.22	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan I.....	87
Tabel 4.23	Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan J.....	88
Tabel 4.24	Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Enzim Fraksi Teraktif/ Etil Asetat.....	89
Tabel 4.25	Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten Fraksi Etil Asetat 8,375ppm.....	89
Tabel 4.26	Hasil identifikasi golongan senyawa pada ekstrak etanol 80%, fraksi etil asetat, dan fraksi G kulit batang <i>Antidesma bunius</i> (L.) Spreng.....	90

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Prosedur Pelaksanaan .....	91
Lampiran 2. Skema Persiapan Sampel dan Ekstraksi .....	92
Lampiran 3. Skema Fraksinasi .....	93
Lampiran 4. Skema Uji Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -glukosidase.....	94
Lampiran 5. Perhitungan unit larutan enzim.....	95
Lampiran 6. Skema prosedur pembuatan unit larutan enzim.....	96
Lampiran 7. Skema prosedur pembuatan larutan substrat PNPG .....	97
Lampiran 8. Surat determinasi tanaman <i>Antidesma bunius</i> .....	98
Lampiran 9. Sertifikat analisis $\alpha$ -glukosidase .....	99
Lampiran 10. Sertifikat analisis substrat 4-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida .....	100





# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) adalah sekelompok gangguan metabolisme karbohidrat, protein, dan lemak yang ditandai dengan hiperglikemia (DiPiro, Talbert, Yee, Matzke, Wells, & Posey, 2011). Diabetes melitus dan komplikasinya merupakan masalah kesehatan yang paling utama dalam masyarakat modern. Organisasi kesehatan dunia memperkirakan pada tahun 2010 Indonesia berada dalam posisi kesembilan dalam jumlah terbesar didunia pasien DM dengan usia 20 sampai 79 tahun setelah India, Cina, Amerika Serikat, Rusia, Brazil, Jerman, Pakistan, dan Jepang. WHO memprediksi kenaikan jumlah penderita diabetes melitus di Indonesia dari 7,0 juta orang pada tahun 2010 menjadi sekitar 12 juta orang pada tahun 2030 (Shaw, Sicree, & Zimmet, 2010).

Meningkatnya prevalensi diabetes melitus di beberapa negara berkembang, seperti Indonesia, akibat dari peningkatan kemakmuran di negara bersangkutan. Peningkatan pendapatan per kapita, banyaknya restoran siap saji, teknologi canggih yang dapat menimbulkan *sedentary life*, dan perubahan gaya hidup terutama di kota-kota besar, menyebabkan peningkatan prevalensi penyakit degeneratif, terutama diabetes melitus. (Sudoyo, Setyiohadi, Alwi, Simadibrata, & Setiati, 2006)

Bahan tanaman dan ekstrak herbal telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional diabetes. Tanaman memiliki kandungan yang kaya akan senyawa polifenol, yang diketahui dapat berinteraksi dengan protein dan dapat menghambat aktivitas enzim (Obloh, Ademiluyi, Akinyemi, Henle, Saliu, Schwarzenbolz, 2012). Sebuah penelitian membuktikan bahwa ekstrak etanol 80% dari kulit batang *Antidesma bunius* memiliki aktivitas penghambatan terhadap  $\alpha$ -glukosidase dengan nilai  $IC_{50}$  3,90 ppm (Elya, Katrin, Mun'im, Yuliasuti, Bangun, & Kurnia, 2012). Hal itu menunjukkan bahwa kulit batang buni dapat berkhasiat sebagai antidiabetes. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka pada penelitian ini dilakukan uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dari

fraksi-fraksi kulit batang buni dan identifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi teraktifnya.

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode refluks menggunakan pelarut etanol 80% dilanjutkan dengan fraksinasi cair-cair menggunakan pelarut yang semakin meningkat kepolarannya yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol. Setiap fraksi diukur aktivitas penghambatannya terhadap  $\alpha$ -glukosidase. Hasil penghambatan reaksi enzimatik tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang 400 nm (Elya, Katrin, Mun'im, Yuliasuti, Bangun, & Kurnia, 2012). Nilai penghambatan ditetapkan dengan menggunakan nilai IC<sub>50</sub>, yaitu konsentrasi yang dapat menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian (Murray, Bender, Botham, Kennelly, Rodwell, & Weil, 2009). Fraksi yang memiliki aktivitas tertinggi dilakukan pemisahan kembali dengan kromatografi kolom vakum. Fraksi kolom digabungkan berdasarkan pola kromatogram KLT kemudian diukur aktivitas penghambatannya terhadap  $\alpha$ -glukosidase. Fraksi yang memiliki aktivitas tertinggi kemudian diidentifikasi golongan senyawanya.

## 1.2 Tujuan Penelitian

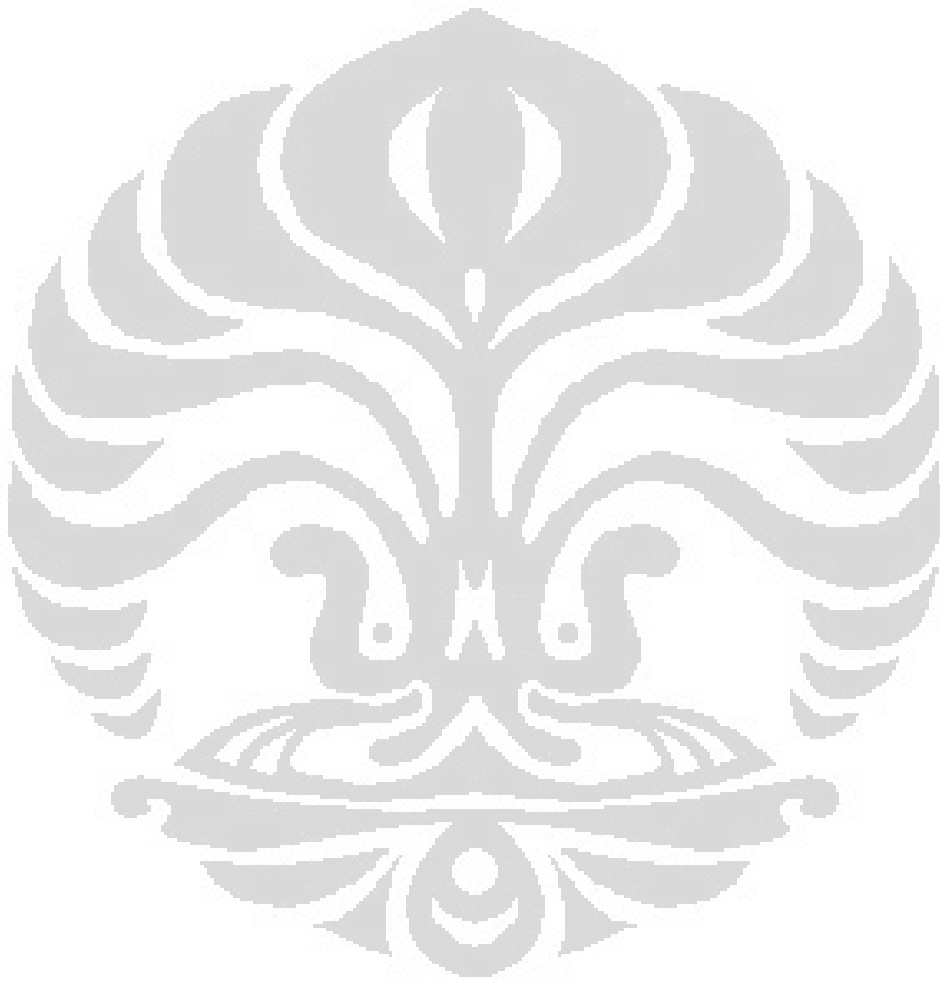
Penelitian ini bertujuan untuk :

- a. Memperoleh fraksi dari hasil fraksinasi cair-cair ekstrak etanol 80% kulit batang buni (*Antidesma bunius* L.) yang memiliki aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase tertinggi dan mekanisme penghambatannya,
- b. Mengetahui golongan senyawa kimia fraksi dari hasil fraksinasi cair-cair yang memiliki aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase tertinggi,
- c. Memperoleh fraksi hasil kromatografi kolom yang memiliki aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase tertinggi,
- d. Mengetahui golongan senyawa kimia dari fraksi hasil kromatografi kolom yang memiliki aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase tertinggi.

## 1.3 Manfaat

Dengan dilakukannya penelitian ini, dapat diketahui tipe mekanisme penghambatan fraksi teraktif dari ekstrak etanol 80% kulit batang buni terhadap  $\alpha$ -glukosidase. Selain itu, penelitian ini dapat menjadi dasar untuk penelitian

selanjutnya, yaitu memperoleh senyawa yang berpotensi menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase sehingga dapat dikembangkan sebagai obat antidiabetes baru.



## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Diabetes Melitus**

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

Diabetes melitus (DM) adalah sekelompok gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang ditandai dengan hiperglikemia akibat defisiensi sekresi insulin atau resistensi sel-sel tubuh terhadap insulin, atau keduanya (LeRoith, Taylor, & Olefsky, 2004). Diabetes melitus diklasifikasikan menjadi 4 tipe, yaitu:

##### **2.1.1.1 Diabetes Melitus tipe 1**

Diabetes melitus tipe 1 disebut juga *insulin dependent diabetes mellitus* (IDDM) (Chisholm-Burns, *et al.*, 2008). DM tipe 1 terjadi 5-10% dari keseluruhan kasus diabetes. Secara umum, DM tipe ini terjadi pada anak-anak atau pada awal masa dewasa yang disebabkan oleh kerusakan sel  $\beta$  pankreas akibat otoimun sehingga terjadi defisiensi insulin absolut. Penderita diabetes tipe 1 sangat kekurangan insulin sehingga pengobatannya diberikan insulin (Poretsky, 2010).

##### **2.1.1.2 Diabetes Melitus tipe 2**

Diabetes melitus tipe 2 adalah penyakit hiperglikemia akibat insensitivitas sel terhadap insulin yang ditandai dengan resistensi insulin atau disfungsi sel  $\beta$ -pankreas (Poretsky, 2010). Pada DM tipe ini, insulin tetap dihasilkan oleh sel-sel  $\beta$  pankreas sehingga disebut sebagai *noninsulin dependent diabetes mellitus* (NIDM). Penderita diabetes melitus tipe ini mencapai 90-95% dari seluruh kasus diabetes melitus (Chisholm-Burns, *et al.*, 2008). DM tipe ini lebih disebabkan karena *sedentary life style*, kurangnya olah raga, dan obesitas (LeRoith, Taylor, & Olefsky, 2004).

### 2.1.1.3 Diabetes Melitus Gestasional

Diabetes Melitus Gestasional (GDM) didefinisikan sebagai suatu intoleransi glukosa yang terjadi pada saat hamil (Sudoyo, Setyohadi, Alwi, Simadibrata, & Setiati, 2006). Penyebab diabetes gestasional dianggap berkaitan dengan peningkatan kadar estrogen dan hormon pertumbuhan selama kehamilan. Estrogen dan hormon pertumbuhan merangsang pengeluaran insulin dan dapat menyebabkan sekresi insulin secara berlebihan yang akhirnya menyebabkan penurunan responsivitas sel (Corwin, 2001).

### 2.1.1.4 Diabetes Tipe Lain

Diabetes tipe ini terjadi sekitar 1-2% dari seluruh kasus diabetes (LeRoith, Taylor, & Olefsky, 2004). Penyebabnya meliputi gangguan endokrin (misalnya akromegali, sindrom *cushing*), penyakit pankreas eksokrin (pankreatitis), dan karena obat (glukokortikoid) (Wells, DiPiro, Schwinghammer, & Hamilton, 2006).

## 2.1.2 Terapi Diabetes Melitus

### 2.1.2.1 Target Terapi

Target utama terapi pada DM adalah untuk mencapai kadar glukosa darah mendekati normal sehingga mengurangi gejala hiperglikemia. Glukosa darah harus selalu dikontrol untuk mengurangi risiko komplikasi penyakit mikrovaskular dan makrovaskular (DiPiro, Talbert, Yee, Matzke, Wells, & Posey, 2011). Kriteria berdasarkan kadar glukosa darah dapat dilihat pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.1** Kriteria berdasarkan kadar glukosa darah

	<b>Normal</b>	<b><i>Impaired Fasting Glucose (IFG)</i></b>	<b><i>Impaired Glucose Tolerance (IGT)</i></b>	<b>Diabetes Melitus</b>
<b>Glukosa puasa</b>				
mg/dL	<100	100–125	-	≥126
mmol/L	<5.6	5.6–6.9	-	≥7.0

**Tabel 2.1** (Lanjutan)

<b>Glukosa setelah makan</b>				
mg/dL	<140	-	140–199	≥200
mmol/L	<7.8	-	7.8–11.0	≥11.1

(sumber : Poretsky, 2010, telah diolah kembali).

*Impaired fasting glucose* dan *impaired glucose tolerance* adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan pasien yang memiliki kadar plasma glukosa lebih tinggi dari normal tetapi tidak terdiagnosa DM. Gangguan ini merupakan faktor risiko penyakit DM. (Wells, DiPiro, Schwinghammer, & Hamilton, 2006).

### 2.1.2.2 Terapi Nonfarmakologi

Langkah pertama dalam menangani diabetes melitus selalu dimulai dengan pengobatan nonfarmakologi (Sudoyo, Setyiohadi, Alwi, Simadibrata, & Setiati, 2006). Penatalaksanaan diabetes melitus nonfarmakologi, antara lain :

#### a. **Diit**

Diit merupakan salah satu terapi nonfarmakologi yang sangat direkomendasikan bagi penderita diabetes. Diit ini prinsipnya adalah melakukan pengaturan pola makan berdasarkan kebutuhan individual. Beberapa faktor yang harus diperhatikan dalam melakukan perubahan pola makan antara lain, berat badan, status gizi, status kesehatan, aktivitas fisik, dan faktor usia (Sudoyo, Setyiohadi, Alwi, Simadibrata, & Setiati, 2006). Penderita diabetes lebih dianjurkan mengonsumsi karbohidrat berserat dan menghindari konsumsi buah-buahan yang terlalu manis (Corwin, 2001).

#### b. **Olahraga**

Latihan fisik pada penderita DM memiliki peranan yang sangat penting dalam mengendalikan kadar gula dalam darah, dimana saat melakukan latihan fisik terjadi peningkatan pemakaian glukosa oleh otot sehingga secara langsung dapat menyebabkan penurunan glukosa darah. (Poretsky, 2010)

### 2.1.2.3 Terapi Farmakologi

Terapi farmakologi ini diberikan jika penerapan terapi nonfarmakologi yang telah dilakukan tidak dapat mengendalikan kadar glukosa darah seperti yang diharapkan. Pemberian terapi farmakologi tetap tidak meninggalkan terapi nonfarmakologi yang telah diterapkan sebelumnya. Terapi farmakologi untuk penyakit diabetes melitus meliputi insulin, agen penghambat  $\alpha$ -glukosidase, tiazolindindion (TZD), agen penginduksi sekresi insulin, dan biguanida. (Sudoyo, Setyiohadi, Alwi, Simadibrata, & Setiati, 2006)

#### a. Insulin

Sediaan insulin umumnya diperoleh dari pankreas hewan, yaitu sapi atau babi. Preparat insulin dapat dibedakan berdasarkan lama kerjanya yang tergantung pada kecepatan absorpsi setelah injeksi subkutan, diantaranya sediaan insulin mula kerja cepat (*short-acting insulin*), insulin masa kerja sedang (*intermediate-duration insulin*), insulin mula kerja cepat dengan masa kerja singkat dan masa kerja panjang (*long-duration insulin*). Mekanisme kerja insulin adalah menurunkan kadar gula darah dengan menstimulasi pengambilan glukosa perifer dan menghambat produksi glukosa hepatic (Poretsky, 2010).

#### b. Sulfonilurea

Sulfonilurea diklasifikasikan menjadi 2 generasi, generasi pertama (tolbutamid, tolazamid, dan klorpropamid) dan generasi kedua (gliburid, glipizid, dan glimepirid). Sulfonilurea meningkatkan sekresi insulin dengan menghambat *ATP-potassium channel membrane* sehingga memungkinkan masuknya kalsium yang menyebabkan translokasi sekresi granul insulin pada permukaan sel dan meningkatkan sekresi insulin. (Chisholm-Burns, *et al.*, 2008)

#### c. Biguanida

Saat ini golongan biguanida yang banyak digunakan adalah metformin (Sudoyo, Setyiohadi, Alwi, Simadibrata, & Setiati, 2006). Agen ini dapat menurunkan glukosa darah dengan meningkatkan sensitivitas insulin, baik di hati maupun jaringan otot perifer. Metformin tidak mempengaruhi pelepasan insulin

dari sel  $\beta$ -pankreas sehingga tidak menyebabkan hipoglikemia. (Chisholm-Burns, *et al.*, 2008)

#### **d. Tiazolidindion**

Obat yang termasuk golongan tiazolidindion adalah pioglitazon dan rosiglitazon. Thiazolidindion diketahui meningkatkan sensitivitas insulin dengan merangsang *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR- $\gamma$ ) sehingga terjadi peningkatan jumlah reseptor insulin dan sensitivitas reseptor insulin. (Chisholm-Burns, *et al.*, 2008)

#### **e. Penghambat $\alpha$ -glukosidase**

Obat yang termasuk golongan penghambat  $\alpha$ -glukosidase adalah akarbose dan miglitol. Mekanisme kerja golongan obat ini adalah menghambat pelepasan glukosa dari pati dan disakarida, komponen karbohidrat utama dalam makanan (Mogensen, 2007). Penghambat  $\alpha$ -glukosidase juga menunda penyerapan karbohidrat di saluran usus sehingga mengurangi kenaikan konsentrasi glukosa darah postprandial (Chisholm-Burns, *et al.*, 2008).

### **2.2 Enzim $\alpha$ -glukosidase dan penghambat $\alpha$ -glukosidase**

$\alpha$ -Glukosidase adalah suatu enzim yang mengkatalisis pemecahan kompleks karbohidrat menjadi gula sederhana di bagian tepi permukaan sel usus halus (Chisholm-Burns, *et al.*, 2008). Enzim  $\alpha$ -glukosidase dapat menghidrolisis ikatan glikosida membentuk  $\alpha$ -D-glukosa sehingga kadar glukosa meningkat (Dewi, *et al.*, 2007).

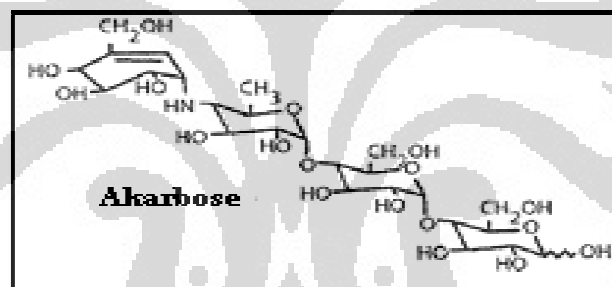
Senyawa yang dapat menghambat aktivitas enzim ini menunjukkan indikasi bahwa senyawa tersebut berpotensi sebagai antidiabetes dengan menurunkan kadar gula dalam darah (Dewi, *et al.*, 2007) sehingga dapat digunakan untuk pengobatan diabetes melitus tipe 2 (Gunawan-Puteri & Kawabata, 2010).

Penghambat  $\alpha$ -glukosidase bertindak sebagai inhibitor kompetitif karena afinitasnya yang tinggi terhadap  $\alpha$ -glukosidase (Mogensen, 2007). Penghambat  $\alpha$ -glukosidase dikontraindikasikan pada pasien dengan *short-bowel syndrome* atau



inflamasi di usus besar (DiPiro, Talbert, Yee, Matzke, Wells, & Posey, 2011). Hal ini dikarenakan penghambat  $\alpha$ -glukosidase menimbulkan efek samping pada sistem gastrointestinal seperti diare, pembentukan gas berlebihan di lambung atau usus, dan rasa tidak nyaman pada perut. Agen penghambat  $\alpha$ -glukosidase dapat digunakan sebagai terapi tunggal atau dikombinasikan. Pasien tidak akan mengalami hipoglikemia kecuali digunakan bersamaan dengan insulin atau obat antidiabetes golongan lain (Chisholm-Burn, *et al.*, 2008).

Salah satu obat yang termasuk golongan penghambat  $\alpha$ -glukosidase ini adalah akarbose. Di Indonesia Akarbose telah dipasarkan dengan nama dagang Glucobay<sup>®</sup> dan Eclid<sup>®</sup>. Akarbose merupakan suatu oligosakarida yang diperoleh dari proses fermentasi mikroorganisme *Actinoplanes utahensis*. Akarbose berupa serbuk berwarna putih dengan berat molekul 645,6 dan pKa 5,1 yang bersifat larut dalam air (Bayer, 2008). Rumus empiriknya adalah  $C_{25}H_{43}NO_{18}$  dengan struktur kimia sebagai berikut:

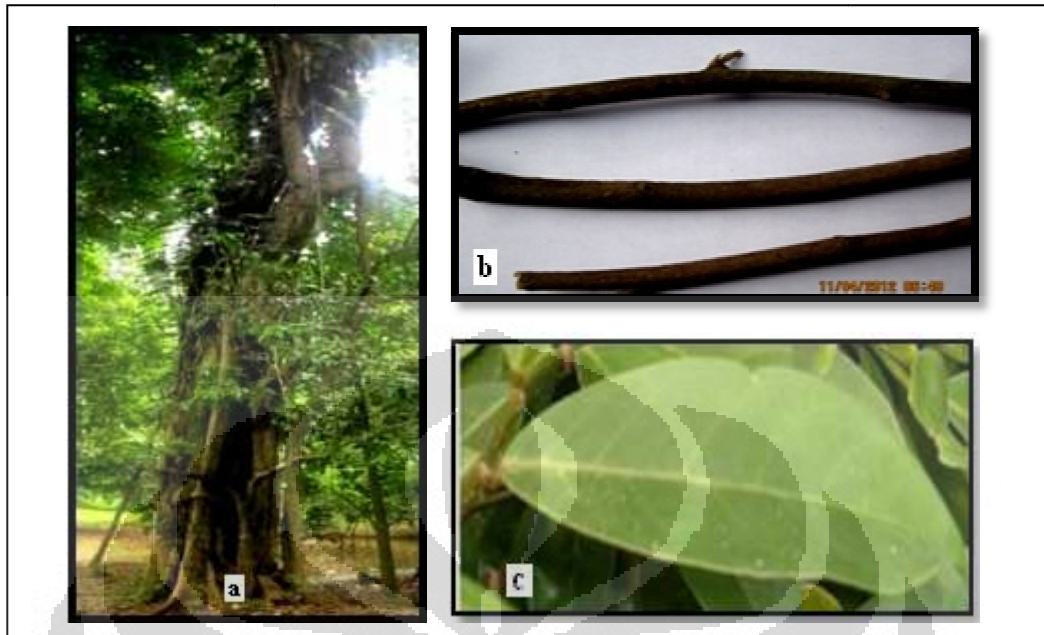


(Sumber : LeRoith, Taylor, & Olefsky, 2004)

**Gambar 2.1** Struktur Kimia Akarbose

Dosis akarbose dimulai dengan dosis rendah (25 mg satu kali sehari sebelum makan), kemudian ditingkatkan secara bertahap setelah beberapa bulan sampai dosis maksimum, yaitu 50 mg tiga kali sehari sebelum makan untuk pasien dengan berat badan 60 kg atau 100 mg tiga kali sehari sebelum makan untuk pasien dengan berat badan >60 kg. (DiPiro, Talbert, Yee, Matzke, Wells, & Posey, 2011)

### 2.3 *Antidesma bunius* L. (Buni)



(sumber : koleksi pribadi)

**Gambar 2.2.** Tanaman (a), ranting (b), dan daun (c) *Antidesma bunius* L.

#### 2.3.1 Klasifikasi tanaman buni (Jones, 1987; Institute of Science National Biological, 1985; dan LIPI, 2009)

Kerajaan : Plantae  
 Divisi : Magnoliophyta (Angiospermae)  
 Kelas : Magnoliopsida (Dycotiledoneae)  
 Bangsa : Euphorbiales  
 Suku : Euphorbiaceae  
 Marga : Antidesma  
 Jenis : *Antidema bunius* L.

Nama Daerah : Barune, huni (sunda); wuni (jawa); buni, katakuti, kutikata (maluku); bune tedong (makasar)

#### 2.3.2 Morfologi

Pohon tingginya hingga 30 m, diameter batang sampai dengan 1 m, biasanya lurus, cabang muda berbentuk silinder atau pipih, berwarna coklat. Kulit batang berwarna coklat karamel, kuning-coklat keabu-abuan, coklat atau

abu-abu, tipis (1-2 mm), biasanya terdapat benjolan kecil. Kulit batang bagian dalam berwarna cokelat kemerahan, memiliki tebal 3-6 mm, dan berserat. Daun berbentuk bulat panjang atau bulat telur, panjang 19-25 cm dan lebar 4-10 cm, berwarna hijau, tepi rata agak bergelombang, ujung meruncing, pangkal tumpul, tulang daun utama jelas tampak di permukaan bawah daun, panjang tangkai daun mencapai 1 cm (Hoffman, 2006; Gruezo, 1991). Buahnya berbentuk bulat, berdiameter 8-10 mm, berwarna hijau, bila masak menjadi ungu kehitaman dan rasanya manis sedikit asam. Biji berbentuk bulat telur, berukuran panjang 6-8 mm dan lebar 4,5-5,5 mm (Gruezo, 1991). Perbanyakkan tanaman dengan biji atau okulasi (LIPI, 2009).

### **2.3.3 Ekologi, penyebaran dan budidaya**

Buni tumbuh liar di India, Sri Lanka, Burma dan Malaysia. Buni telah dibudidayakan di Indonesia, terutama di Jawa. Buni dapat tumbuh hingga ketinggian >1000 m dpl. Di Indonesia, buni dapat tumbuh di daerah kering di bagian timur Jawa atau pun di bagian barat Jawa yang beriklim lembab. (Gruezo, 1991)

### **2.3.4 Kandungan Kimia**

Ekstrak metanol dari buah buni mengandung asam organik, asam fenolik, dan flavonoid. Beberapa flavonoid, yaitu antosianin, luteolin, rutin, kuersetin, katekin, dan prosianidin ditemukan di dalam buah (Herrera, *et al.*, 2011). Kulit batang tanaman buni mengandung alkaloid dan flavonoid. Kandungan yang diperkirakan memiliki efek toksik pada buni adalah flavonoid dan alkaloid sehingga efek sitotoksik yang diberikan kulit batang lebih tinggi dibandingkan buah (Puspitasari & Ulfa, 2009). Kulit batang rasanya sepat karena mengandung sedikit alkaloid. Pada daunnya mengandung Friedelin (LIPI, 2009).

### **2.3.5 Manfaat**

Bagian tanaman yang digunakan adalah buah, kulit batang, dan daun (LIPI, 2009). Buah buni secara tradisional telah digunakan oleh orang Filipina asli, dengan direbus atau dimakan mentah, untuk mengobati diabetes dan

hipertensi. Ekstrak etanol buah buni menunjukkan aktivitas antihiperglikemia yang signifikan pada tikus normal dan yang diinduksi aloksan (Herrera, 2011). Sebuah penelitian juga membuktikan bahwa ekstrak etanol 80% dari kulit batang buni memiliki aktivitas penghambat  $\alpha$ -glukosidase dengan  $IC_{50}$  3,9 ppm (Elya, Katrin, Mun'im, Yuliasuti, Bangun, & Kurnia, 2012).

#### **2.4 Simplisia**

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia berdasarkan sumbernya dapat dibedakan menjadi tiga, yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan, atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan adalah simplisia yang berupa bahan pelikan (mineral) yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana atau belum berupa zat kimia murni. (Depkes RI, 1995a)

#### **2.5 Ekstraksi dan Ekstrak**

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Cara ekstraksi dengan menggunakan pelarut ada dua jenis yaitu cara dingin dan cara panas. Cara dingin terdiri dari maserasi dan perkolasi. Sedangkan, cara panas antara lain refluks, soxhlet, digesti, infus, dan dekok. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Faktor-faktor yang harus dipertimbangkan dalam pemilihan pelarut adalah selektivitas, ekonomis, ramah lingkungan, dan keamanan. (Depkes RI, 2000)

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang

diperoleh diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 1995a).

## **2.5.1 Cara Dingin (Depkes RI, 2000)**

### **2.5.1.1 Maserasi**

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Cairan penyari yang digunakan dapat berupa air, etanol, metanol, etanol-air atau pelarut lainnya. Remaserasi berarti dilakukan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya. Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana.

### **2.5.1.2 Perkolasi**

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

## **2.5.2 Cara Panas (Depkes RI, 2000)**

### **2.5.2.1 Refluks**

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

### **2.5.2.2 Soxhlet**

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

### 2.5.2.3 Digesti

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

### 2.5.2.4 Infus

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

### 2.5.2.5 Dekok

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

## 2.6 Enzim

### 2.6.1 Karakter Enzim

Enzim merupakan biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai katalis dalam metabolisme tubuh. Katalis adalah substansi yang hanya mempercepat laju reaksi kimia dalam tubuh, tetapi tidak ikut bereaksi atau mengalami perubahan selama reaksi tersebut (McPherson & Pincus, 2011). Enzim mengkatalisis konversi satu atau lebih senyawa (substrat) menjadi satu atau lebih senyawa lain (produk) dengan meningkatkan laju reaksinya 10<sup>6</sup> kali lebih cepat dibandingkan tanpa katalis (Murray, Bender, Botham, Kennelly, Rodwell, & Weil, 2009).

Molekul enzim memiliki kantung khusus yang disebut *active site*. *Active site* ini mengandung rantai samping asam amino yang membentuk permukaan tiga dimensi. *Active site* ini akan mengikat substrat kemudian membentuk kompleks enzim-substrat (ES). ES diubah menjadi enzim-produk (EP) yang kemudian akan berdisosiasi menjadi enzim bebas dan produk. (Harvey & Ferrier, 2011)

Laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu konsentrasi substrat, temperatur, dan pH. Peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan kecepatan reaksi hingga mencapai nilai maksimum (V<sub>max</sub>).

Namun jika penambahan substrat tidak lagi mempengaruhi kecepatan reaksi enzim, hal ini berarti enzim telah jenuh oleh substrat. Peningkatan suhu juga dapat meningkatkan laju reaksi katalisis enzim dengan meningkatkan energi kinetik dan frekuensi tumbukan dari molekul yang bereaksi. Namun ketika suhu terus dinaikkan, akan tercapai titik dimana enzim tidak aktif lagi (Murray, Bender, Botham, Kennelly, Rodwell, & Weil, 2009). Enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menghasilkan aktivitas maksimal. Nilai pH yang ekstrim akan dapat mendenaturasi enzim (Harvey & Ferrier, 2011).

### 2.6.2 Penghambatan Aktivitas Enzim

Inhibitor merupakan suatu substansi yang dapat mengganggu aksi enzim dan menurunkan kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Penghambatan yang dilakukan berupa penghambatan *reversible* atau *irreversible*. Dalam penghambatan ireversibel, ikatan kovalen terbentuk antara inhibitor dan enzim, dan aktivitas enzim tidak dapat dikembalikan dengan disosiasi inhibitor. Penghambatan reversibel dapat berupa penghambatan kompetitif dan penghambatan nonkompetitif. (Campbell & Farrell, 2008)

Inhibisi kompetitif terjadi ketika inhibitor berkompetisi dengan substrat untuk berikatan di situs aktif yang sama. Substrat dan inhibitor secara struktural mirip sehingga inhibitor dapat berikatan pada situs aktif dan menghalangi substrat untuk berikatan pada situs aktif membentuk kompleks enzim-inhibitor (EI) yang tidak dapat menghasilkan produk (Harvey & Ferrier, 2011).

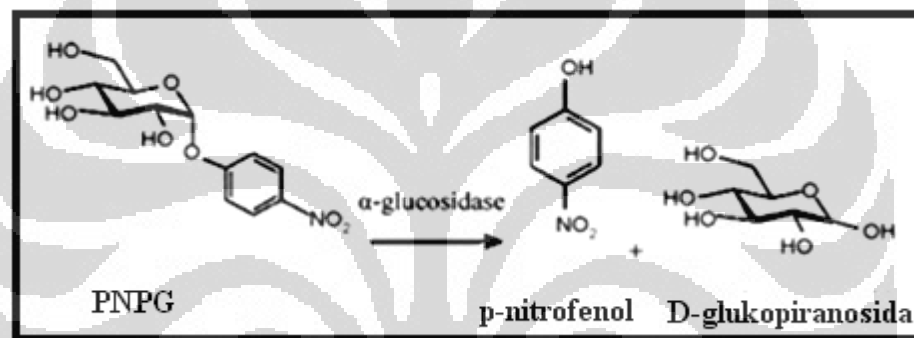
Inhibisi nonkompetitif terjadi ketika inhibitor berikatan di sisi lain dari enzim yang telah berikatan dengan substrat sehingga membentuk kompleks enzim-substrat-inhibitor (ESI) yang tidak dapat menghasilkan produk. Inhibisi ini tidak dapat diatasi dengan penambahan konsentrasi substrat karena inhibitor tidak mempengaruhi pengikatan substrat tetapi mengurangi jumlah enzim-substrat (ES) yang dapat membentuk produk. (Wilson & Walker, 2010)

### 2.6.3 Uji Penghambatan Aktivitas Enzim $\alpha$ -Glukosidase

Banyak substrat dan produk yang dapat menyerap cahaya tampak atau ultraviolet sehingga dalam pengujian penghambatan aktivitas enzim dapat

dilakukan dengan metode spektrofotometri dimana absorbansi produk dapat digunakan sebagai dasar untuk pengujian enzim tersebut. Metode spektrofotometri banyak digunakan dalam pengujian aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase secara *in vitro* dengan menggunakan substrat seperti p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) (Wilson & Walker, 2010). Metode spektrofotometri ini digunakan karena mudah dilakukan dan mampu memberikan hasil yang akurat, cepat, dan tepat (Eisenthal & Danson, 2002).

Enzim  $\alpha$ -glukosidase yang diisolasi dari *Saccharomyces cerevisiae* direaksikan dengan substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) akan menghasilkan p-nitrofenol yang dalam rentang pH 5,6-7,6 berwarna kuning (Wilson & Walker, 2010).



(Sumber : Guo, *et al.*, 2010, telah diolah kembali)

**Gambar 2.3** Reaksi enzimatik  $\alpha$ -glukosidase dan p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida

Aktivitas enzim diukur berdasarkan hasil pengukuran absorbansi p-nitrofenol. Intensitas warna kuning yang terbentuk ditentukan absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm (Elya, Katrin, Mun'im, Yuliasuti, Bangun, & Kurnia, 2012). Apabila ekstrak tanaman memiliki kemampuan menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase maka p-nitrofenol yang dihasilkan akan berkurang (Dewi, *et al.*, 2007).

#### 2.6.4 Penentuan Kinetika Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase

Kinetika enzim berkaitan dengan pengukuran kecepatan reaksi terkatalisis enzim secara kuantitatif. Analisis kinetika ini dapat mengungkap rincian mekanisme katalitik suatu enzim (Murray, Bender, Botham, Kennelly, Rodwell,



dan Weil, 2009). Penentuan kinetika meliputi penentuan nilai konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan plot Lineweaver-Burk.

Konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) menyatakan hubungan yang tepat antara konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi enzimatik. Konstanta Michaelis-Menten dapat didefinisikan sebagai konsentrasi substrat pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimumnya. (Murray, Bender, Botham, Kennelly, Rodwell, dan Weil, 2009, hal.67-68)

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

dibalik

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

faktor

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

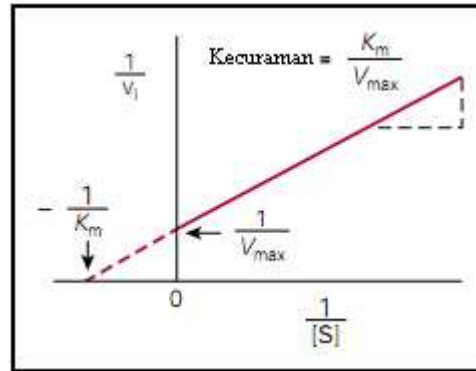
dan disederhanakan

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

Keterangan :

$V_i$  = kecepatan reaksi awal       $K_m$  = konstanta Michaelis  
 $V_{\max}$  = kecepatan maksimum       $[S]$  = konsentrasi substrat

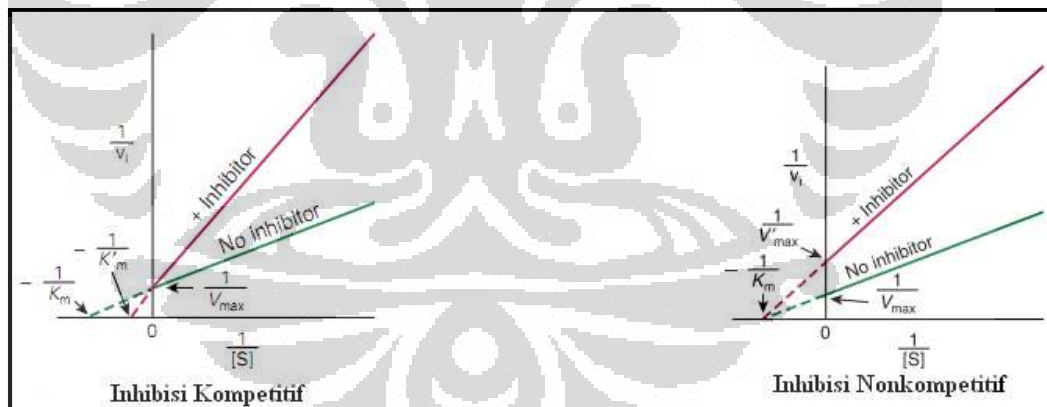
Jika  $1/V_i$  diplotkan terhadap  $1/[S]$  maka akan diperoleh garis lurus (gambar 2.4). Plot ini disebut sebagai plot Lineweaver-Burk yang dapat digunakan untuk menghitung  $K_m$  dan  $V_{\max}$  sekaligus untuk mengukur mekanisme aksi inhibitor enzim (Harvey & Ferrier, 2011). Persamaan 2.4 adalah 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  $K_m/V_{\max}$ .



(Sumber : Murray, Bender, Botham, Kennelly, Rodwell, dan Weil, 2009, telah diolah kembali)

**Gambar 2.4** Plot resiprokal-ganda atau Lineweaver-Burk digunakan untuk mengevaluasi Nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$

Plot Lineweaver-Burk adalah plot kurva substrat-penghambat dan substrat-tanpa penghambat. Perbedaan plot Lineweaver-Burk antara penghambat kompetitif dan nonkompetitif dapat dilihat pada Gambar 2.5. Kurva penghambat kompetitif dan kurva tanpa penghambat akan berpotongan di sumbu y. Sedangkan, kurva penghambat nonkompetitif dan kurva tanpa penghambat akan berpotongan di sumbu x.



(Sumber : Murray, Bender, Botham, Kennelly, Rodwell, dan Weil, 2009, telah diolah kembali)

**Gambar 2.5** Plot Resiprokal-Ganda atau Lineweaver-Burk Inhibisi Kompetitif dan Nonkompetitif

## 2.7 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri merupakan pengukuran suatu interaksi antara radiasi elektromagnetik dan molekul atau atom dari suatu zat kimia (Depkes RI, 1995a). Radiasi elektromagnetik, yang mana sinar ultraviolet dan sinar tampak merupakan

salah satunya, dianggap sebagai energi yang merambat dalam bentuk gelombang (Gandjar & Rohman, 2007). Pengukuran serapan dapat dilakukan pada panjang gelombang daerah ultraviolet (panjang gelombang 190 nm–380 nm) atau pada daerah cahaya tampak (panjang gelombang 380 nm–780 nm) (Depkes RI, 1979).

Spektrum serapan adalah suatu grafik yang menghubungkan antara banyaknya sinar yang diserap dengan frekuensi atau panjang gelombang sinar (Depkes RI, 1979). Spektra uv-vis dapat digunakan untuk informasi kualitatif dan analisis kuantitatif. Banyaknya sinar yang diabsorpsi pada panjang gelombang tertentu sebanding dengan banyaknya molekul yang menyerap radiasi, sehingga spektrum serapan juga dapat digunakan untuk analisis kuantitatif (Gandjar & Rohman, 2007).

Senyawa atau zat yang dapat diperiksa dengan spektrofotometer adalah yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang lebih dikenal dengan istilah kromofor. Senyawa yang mengandung gugus kromofor akan menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak jika diikat oleh senyawa-senyawa bukan pengabsorpsi (auksokrom). Gugus auksokrom yaitu gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas, seperti  $-OH$ ,  $-O$ ,  $-NH_2$ , dan  $-OCH_3$ . Terikatnya gugus auksokrom pada gugus kromofor akan mengakibatkan pergeseran pita absorpsi menuju panjang gelombang yang lebih besar disertai dengan peningkatan intensitas (Gandjar & Rohman, 2007).

Dalam penelitian ini metode spektrofotometri digunakan untuk mengukur serapan yang dihasilkan oleh p-nitrofenol yang merupakan produk hasil reaksi substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan adanya enzim  $\alpha$ -glukosidase. (Wilson & Walker, 2010).

## **2.8 Pola Kromatogram, Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Kolom, serta Penapisan Fitokimia Fraksi Aktif**

### **2.8.1 Pola Kromatogram**

Pola kromatogram berguna untuk memberikan gambaran awal komposisi kandungan kimia berdasarkan pola kromatogram (KLT). Penilaiannya adalah

dengan membandingkan kesamaan pola dengan data baku yang ditetapkan terlebih dahulu (Depkes RI, 2000).

### 2.8.2 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan pada adsorpsi, partisi, atau kombinasi keduanya, tergantung dari jenis zat penyangga, cara pembuatan, dan jenis pelarut yang digunakan (Depkes RI, 1995a). Teknik kromatografi lapis tipis menggunakan suatu adsorben yang disalutkan pada suatu lempeng sebagai fase stasionernya dan pengembangan kromatogram terjadi ketika fase gerak melewati adsorben (Bassett, Denney, Jeffery, & Mendham, 1994).

Beberapa contoh zat penyerap yang digunakan untuk pemisahan dalam kromatografi lapisan tipis adalah sebagai berikut:

**Tabel 2.2** Zat Penyerap untuk Kromatografi Lapisan Tipis

No.	Zat Padat	Digunakan untuk Pemisahan
1.	Silika gel	Steroid, asam amino, alkohol, hidrokarbon, lipid, alkaloid.
2.	Alumina (Aluminium oksida)	Alkohol, amin, steroid, lipid, alkaloid.
3.	Kieselguhr (Tanah diatom)	Karbohidrat, gula, alkohol, asam lemak, asam amino, asam karboksilat
4.	Bubuk selulosa	Asam amino, karbohidrat, nukleotida.
6.	Gel sephadex	Asam amino, kompleks logam, protein.

(Sumber : Touchstone & Dobbins, 1983; Gandjar & Rohman, 2007, telah diolah kembali)

Fase gerak pada KLT dapat menggunakan campuran dua pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut dapat menghasilkan pemisahan yang optimal. Daya elusi fase gerak harus diatur sehingga harga Rf terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan (Gandjar & Rohman, 2007). Derajat retensi dinyatakan dengan Rf yang digunakan untuk menyatakan posisi dari zat setelah pengembangan, dapat dihitung dengan (Alexander & Griffiths, 1993) :

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

KLT digunakan secara luas untuk analisis banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, menentukan kondisi yang sesuai untuk kromatografi kolom, dan untuk melakukan *screening* sampel obat. (Gandjar & Rohman, 2007)

### 2.8.3 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan metode kromatografi cair yang digunakan untuk pemisahan campuran. Kromatografi kolom terbagi dua jenis yaitu kromatografi kolom lambat dan kromatografi kolom dipercepat. Pada kromatografi kolom dipercepat, pelarut pengembang didorong dengan cepat (dengan bantuan vakum) melalui kolom yang berisi penjerap basah. Pada kromatografi kolom, perlu dipastikan pelarut atau campuran pelarut yang dapat menghasilkan pemisahan yang diinginkan. (Gritter, Bobbitt, & Schwarting, 1991)

Fase diam yang digunakan dapat berupa silika gel, selulosa atau poliamida. Sedangkan fase gerak dapat dimulai dengan pelarut non polar kemudian ditingkatkan kepolarannya secara bertahap, baik dengan pelarut tunggal ataupun kombinasi dua pelarut yang berbeda kepolarannya dengan perbandingan tertentu sesuai tingkat kepolaran yang dibutuhkan. Fraksi yang diperoleh dari kolom kromatografi ditampung dan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis.

### 2.8.4 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia adalah pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan. Pemeriksaan diarahkan pada senyawa metabolit sekunder yang diduga memiliki aktivitas penghambatan terhadap  $\alpha$ -glukosidase, seperti alkaloid, flavonoid, terpen, tanin, saponin, glikosida, kuinon dan antrakuinon.

#### 2.8.4.1 Alkaloid

Alkaloid adalah golongan senyawa yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam gabungan berbentuk siklik. Alkaloid sebagian besar berbentuk kristal padat, sebagian kecil berupa cairan, dan terasa pahit. (Harborne, 1987; Singh, 2002)

#### 2.8.4.2 Senyawa Fenol dan Flavonoid

Senyawa fenol merupakan senyawa yang memiliki cincin aromatik dan mengandung satu atau dua gugus hidroksil. Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang menghambat banyak reaksi oksidasi baik secara enzimatik maupun non enzimatik. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai glikosida dan aglikon flavonoid. Biasanya dalam menganalisis flavonoid, yang diperiksa ialah aglikon dalam ekstrak tumbuhan yang sudah dihidrolisis. Pendeteksian adanya senyawa ini dapat dilakukan dengan menambahkan larutan besi (III) klorida 1% dalam air atau etanol yang menimbulkan warna hijau, merah ungu, biru atau hitam kuat. (Harborne, 1987; Singh, 2002)

#### 2.8.4.3 Terpen

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

Biasanya senyawa ini diekstraksi dengan menggunakan eter dan kloroform. Steroid merupakan senyawa triterpen yang terdapat dalam bentuk glikosida. Senyawa ini biasanya diidentifikasi dengan reaksi Liebermann-Bouchard (anhidrat asetat- $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) yang memberikan warna hijau kehitaman sampai biru.

#### 2.8.4.4 Tanin

Tanin merupakan senyawa yang umum terdapat dalam tumbuhan berpembuluh, memiliki gugus fenol, memiliki rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit karena kemampuannya menyambung-silang protein. Jika bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tak larut dalam air. Secara kimia, tanin dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu tanin kondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi atau flavolan secara biosntesis terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal yang membentuk senyawa dimer atau oligomer. Tanin terhidrolisis mengandung ikatan ester yang

dapat terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer. Tanin dapat diidentifikasi dengan menggunakan cara pengendapan menggunakan larutan gelatin 10%, campuran natrium klorida-gelatin, besi (III) klorida 3%, dan timbal (II) asetat 25%. (Harborne, 1987)

#### **2.8.4.5 Saponin**

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

#### **2.8.4.6 Glikosida**

Glikosida merupakan suatu senyawa yang bila dihidrolisis akan terurai menjadi gula (glikon) dan aglikon. Pada umumnya glikon berupa glukosa, fruktosa, laktosa, galaktosa dan manosa. Aglikon (genin) biasanya mempunyai gugus -OH dalam bentuk alkohol atau fenol. Kegunaan glikosida bagi tanaman adalah untuk cadangan gula sementara. (Harborne, 1987)

#### **2.8.4.7 Kuinon dan Antrakuinon**

Kuinon merupakan senyawa berwarna dan memiliki kromofor dasar. Untuk tujuan identifikasi, kuinon dibagi menjadi empat kelompok, diantaranya adalah benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon dan isoprenoid. Kelompok benzokuinon, naftokuinon dan antrakuinon diperlukan hidrolisis asam untuk melepas kuinon bebasnya. (Harborne, 1987)

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia, Laboratorium Kimia Kuantitatif, dan Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok. Penelitian dimulai dari bulan Februari hingga Mei 2012.

### 3.2 Alat

Timbangan analitik, alat penggiling (Phillips), *rotary vacuum evaporator* (rotary evaporator buchii), pH meter (Eutech Instruments), alat refluks, kondensor, penyaring buchner, *freezer* dengan temperatur  $-20^{\circ}\text{C}$  (Gea®), lemari pendingin dengan temperatur  $2-6^{\circ}\text{C}$  (Gea®), termometer, vortex mixer (VM-2000), oven (Hotpack), mikropipet [Acura®, Swiss; Fortuna®, Singapura], *microtube* (eppendorf®), inkubator/*Orbital Shaker Incubator* suhu  $37^{\circ}\text{C}$  (Lab-line®), inkubator suhu  $30$  dan  $40^{\circ}\text{C}$  (Imperial Waterbath®), spektrofotometer shimadzu UV-1601, kuvet, pipet volum, alkoholmeter, *freeze dry* (Scanvac®), *hot plate* (Yellow line MAG HS7), *vacuum pump*, peralatan kromatografi kolom, bejana KLT, pipa kepiler, vial dan botol penampung berbagai ukuran, serta alat-alat gelas.

### 3.3 Bahan

#### 3.3.1 Bahan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang buni (*Antidesma bunius* L.) yang berasal dari Kebun Raya Bogor dan telah diidentifikasi oleh Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

#### 3.3.2 Bahan Kimia

Enzim  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA), p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (Sigma-Aldrich, USA), *bovine*



*serum albumin* (Merck, Jerman), akarbose (Dexa Medica, Indonesia), kuersetin (Sigma-Aldrich, USA), kalium dihidrogen fosfat (Merck, Jerman), dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck, Jerman), etil asetat, n-heksana, metanol, etanol, akuades, akuademineralisata, silika gel 60 H (Merck, Jerman), silika gel 60 (Merck, Jerman), silika gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Jerman), kalium iodida, bismut nitrat, kalium hidroksida, natrium hidoksida (Univar, USA), natrium karbonat (Merck, Jerman), asam klorida (Merck, Jerman), asam nitrat (Merck, Jerman), gelatin, besi (III) klorida, asam sulfat (Merck, Jerman).

### 3.4 Prosedur Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap seperti diperlihatkan pada diagram alir penelitian (Lampiran 1) yang terdiri dari:

- a. Penyiapan bahan uji,
- b. Ekstraksi simplisia,
- c. Fraksinasi,
- d. Uji pendahuluan aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase (penetapan panjang gelombang p-nitrofenol, optimasi konsentrasi substrat, optimasi pH, dan optimasi suhu inkubasi),
- e. Uji aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase dari berbagai fraksi hasil fraksinasi cair-cair, kemudian dilakukan penapisan fitokimia dari fraksi teraktif,
- f. Pemisahan dengan kromatografi kolom, kemudian dilakukan penggabungan fraksi dengan KLT,
- g. Uji aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase dari fraksi hasil kromatografi kolom,
- h. Uji kinetika penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase dari fraksi teraktif
- i. Identifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi teraktif.

#### 3.4.1 Penyiapan Bahan Uji

##### 3.4.1.1 Persiapan Simplisia Uji

Penelitian ini menggunakan simplisia kulit batang. Kulit batang dikumpulkan selanjutnya disortasi, dibersihkan dari pengotor dan dicuci dengan

air mengalir hingga bersih lalu ditimbang. Kulit batang tersebut kemudian dikeringkan dalam ruangan ber-AC hingga simplisia menjadi kering. Untuk memastikan pengeringan, simplisia kulit batang buni dimasukkan ke dalam oven pada suhu 60°C selama 6 jam. Selanjutnya, ditimbang dan dihitung persentase penyusutan bobot simplisia kulit batang buni setelah pengeringan. Simplisia yang telah kering disortasi kembali untuk memisahkan pengotor yang tertinggal, kemudian dibuat serbuk dengan menggunakan alat penggiling.

#### **3.4.1.2 Penyiapan Larutan Pereaksi Kimia** (Depkes RI, 1979; Depkes RI, 1995; Wagner & Bladt, 1996)

##### **a. Etanol 80%**

Etanol 80% dibuat dari etanol 96% yang diencerkan. Etanol 96% sebanyak 800 mL diencerkan dengan akuades sedikit demi sedikit disertai pengecekan menggunakan alkoholmeter. Penambahan akuades dilakukan terus-menerus hingga batas alkoholmeter menunjukkan angka 80.

##### **b. Natrium Hidroksida 0,1 N**

Larutan natrium hidroksida 0,1 N dibuat dengan melarutkan 4 g NaOH dengan akuades secukupnya hingga 100,0 mL.

##### **c. 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.

##### **d. Larutan bismut nitrat**

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

##### **e. Larutan kalium iodida**

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

**f. Penampak bercak vanilin-asam sulfat**

Larutan vanilin-asam sulfat dibuat dengan cara mencampurkan 5 mL asam sulfat pekat dalam 100 mL etanol (larutan A) dan melarutkan 1 g vanilin dalam 100 mL etanol (larutan B).

**g. Penampak bercak KOH**

Larutan KOH dibuat dengan cara mencampurkan 5 g kalium hidroksida dalam 100 mL etanol.

**h. Penampak bercak Dragendorff**

Larutan pereaksi Dragendorff dibuat dari campuran larutan bismut nitrat 40% b/v dalam asam nitrat dan larutan kalium iodida 54,4% b/v. Kedua larutan dicampur dan didiamkan hingga memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan dicukupkan dengan akuades hingga 100 mL.

**i. Penampak bercak  $\text{AlCl}_3$  0,5%**

Larutan  $\text{AlCl}_3$  dibuat dengan melarutkan 0,5 g Aluminium klorida dalam 100 mL etanol.

**j. Penampak bercak  $\text{FeCl}_3$  1%**

Larutan  $\text{FeCl}_3$  dibuat dengan cara melarutkan 1 g besi (III) klorida dalam 100 mL akuades.

**k. Larutan asam klorida 2 N**

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

**l. Larutan Pereaksi Molisch**

Larutan pereaksi Molisch dibuat dengan cara melarutkan 10 g  $\alpha$ -naftol P dalam 100 mL metanol.

**m. Larutan gelatin 10%**

Larutan gelatin 10% dibuat dengan cara melarutkan 10 g gelatin dalam 100 mL akuades.

**n. 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.

**o. 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.

**3.4.1.3 Penyiapan Larutan Pereaksi Uji Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase****a. Larutan kalium dihidrogenfosfat 0,2 M (Depkes RI, 1979)**

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

**b. Larutan Dapar Fosfat pH 6,6 (Depkes RI, 1979)**

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 setiap kali penambahan natrium hidroksida 0,1 N menggunakan pH meter hingga tercapai pH 6,6. Campuran tersebut kemudian ditambahkan dengan air bebas CO<sub>2</sub> secukupnya hingga 200,0 mL.

**c. Larutan Dapar Fosfat pH 6,8 (Depkes RI, 1979)**

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 hingga tercapai pH 6,8. Campuran tersebut kemudian ditambahkan dengan air bebas CO<sub>2</sub> secukupnya hingga 200,0 mL.

**d. Larutan Dapar Fosfat pH 7,0 (Depkes RI, 1979)**

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 hingga tercapai pH 7,0. Campuran tersebut kemudian ditambahkan dengan air bebas CO<sub>2</sub> secukupnya hingga 200,0 mL.

**e. Larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA)**

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

**f. Larutan Enzim  $\alpha$ -Glukosidase**

Larutan enzim dibuat dengan melarutkan 10,1 mg  $\alpha$ -glukosidase dalam 100 mL dapar fosfat (pH 6,6; 6,8; dan 7,0) yang mengandung gliserol 50% sehingga diperoleh larutan induk enzim 4,5 U/mL. Selanjutnya dipipet 1,0 mL larutan induk enzim 4,5 U/mL dan dicukupkan volumenya dengan dapar fosfat yang mengandung BSA 0,2% b/v hingga 10,0 mL dan didapatkan larutan enzim 0,45 U/mL. Kemudian dipipet 1,0 mL larutan enzim 0,45 U/mL lalu ditambahkan dapar fosfat yang mengandung BSA 0,2% b/v sebanyak 2,0 mL sehingga diperoleh larutan enzim 0,15 U/mL seperti pada Lampiran 6.

Pada saat melarutkan serbuk enzim, dilakukan pengocokkan secara perlahan sehingga tidak menimbulkan buih. Proses pengerjaan dilakukan dalam kondisi dingin dengan menggunakan *ice box*. Larutan induk enzim 4,5 U/mL

disimpan dalam *freezer* dengan temperatur  $-20^{\circ}\text{C}$  sehingga tetap stabil hingga 1 bulan. Sementara, larutan enzim 0,45 U/mL disimpan dalam lemari pendingin dengan temperatur  $2-6^{\circ}\text{C}$  sehingga tetap stabil hingga 1 minggu. (Sigma, 1996)

**g. Larutan Substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida 30; 20; 15; 10; 5; 2,5; 2; dan 1 mM**

Larutan substrat dibuat dengan cara melarutkan 90,4 mg p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dalam 10,0 mL akuademineralisata dingin sehingga diperoleh larutan substrat 30 mM. Larutan substrat dapat diencerkan dengan akuades hingga diperoleh larutan substrat 20; 15; 10; 5; 2,5; 2; dan 1 mM seperti pada Lampiran 7. Untuk mempercepat kelarutan PNPG dalam akuademineralisata dapat dilakukan dengan bantuan vortex. Larutan substrat PNPG harus segar dan harus segera digunakan setelah dibuat dan tidak bisa disimpan.

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

Larutan natrium karbonat 200 mM dibuat dengan cara melarutkan 21,2 g natrium karbonat dengan akuades secukupnya hingga 1000,0 mL.

**i. Larutan Akarbose**

Akarbose ditimbang seksama sebanyak 200,0 mg dan dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat pH 6,8 hingga diperoleh konsentrasi larutan standar 2%. Larutan standar 2% diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar 1; 0,5; 0,25; 0,125; dan 0,0625%.

**j. Larutan Kuersetin**

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

**k. Larutan Sampel Uji**

Ekstrak ditimbang seksama sebanyak 100,0 mg dan dilarutkan dalam 5 mL dimetil sulfoksida kemudian dicukupkan volumenya hingga batas pada labu ukur

dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 1%. Larutan ekstrak 1% diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; dan 0,03125%.

### 3.4.2 Ekstraksi

Simplisia kering sebanyak 590,4 g diekstraksi menggunakan etanol 80% dengan metode refluks selama 1 jam, dilakukan sebanyak 3 kali. Ekstrak kemudian disaring lalu diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40-50°C hingga menjadi ekstrak kental. Selanjutnya timbang ekstrak kental etanol yang diperoleh dan dihitung rendemennya terhadap berat simplisia awal. Skema persiapan sampel dan ekstraksi ada pada Lampiran 2.

### 3.4.3 Fraksinasi

Ekstrak kental etanol 80% sebanyak 128,8 gr kemudian difraksinasi menggunakan pelarut yang semakin meningkat kepolarannya yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol. Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi menggunakan corong pisah. Namun, sebelum difraksinasi, ekstrak kental etanol didispersikan dengan air panas sebanyak 250 mL terlebih dahulu, kemudian dipartisi dengan menambahkan n-heksana sebanyak dua kali (volume n-heksana total yang digunakan 15 L). Ekstrak n-heksana diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental n-heksana, sedangkan ekstrak air selanjutnya difraksinasi kembali dengan cara yang sama menggunakan pelarut etil asetat sebanyak tiga kali (volume etil asetat total yang digunakan 15 L). Ekstrak etil asetat diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat, sedangkan ekstrak air dilakukan *freeze dry* hingga terbentuk serbuk, selanjutnya ditambahkan metanol 5 mL lalu diuapkan dengan bantuan *vacuum pump* hingga diperoleh ekstrak kental metanol. Skema fraksinasi ada pada Lampiran 3.

### 3.4.4 Uji Pendahuluan Aktivitas Enzim $\alpha$ -Glukosidase

Uji pendahuluan dilakukan terlebih dahulu sebelum melakukan uji aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase. Uji pendahuluan ini bertujuan untuk

mengetahui kondisi yang optimum untuk uji aktivitas. Parameter yang perlu dioptimasi pada uji pendahuluan, yaitu konsentrasi substrat, pH dan suhu aktivitas. Selain itu dilakukan pula penentuan panjang gelombang p-nitrofenol.

#### 3.4.4.1 Penentuan Panjang Gelombang p-Nitrofenol

Larutan dimetil sulfoksida (DMSO) sebanyak 5  $\mu\text{L}$  ditambahkan 245  $\mu\text{L}$  larutan dapar fosfat pH 6,8 dan 125  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) 10 mM, campuran diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, ke dalam campuran ditambahkan 125  $\mu\text{L}$  larutan enzim 0,15 U/mL seperti dalam perhitungan pada Lampiran 5, campuran diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1000  $\mu\text{L}$  natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 200 mM. Campuran reaksi diukur absorbansinya dengan spektrofotometer. Pada uji larutan kontrol, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim (Tabel 3.1).

**Tabel 3.1 Penentuan panjang gelombang p-nitrofenol**

Reagen	Volume larutan uji ( $\mu\text{L}$ )
DMSO	5
Dapar fosfat (pH 6,8)	245
PNPG (10 mM)	125
<b>Inkubasi 37°C, 5 menit</b>	
Enzim (0,15 U/mL)	125
<b>Inkubasi 37°C, 15 menit</b>	
Natrium karbonat 200 mM	1000
Volume total	1500
<b>Ukur absorbansi p-nitrofenol yang terbentuk</b>	

#### 3.4.4.2 Optimasi Konsentrasi Substrat (p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida) dengan Volume Total 1,5 mL

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 5  $\mu\text{L}$  dimetil sulfoksida (DMSO), 245  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pH 6,8 dan 125  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi masing-masing 30; 20; 15; 10; 5;



2,5; 2; dan 1 mM, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Larutan uji, ditambahkan 125 µL larutan enzim 0,15 U/mL selanjutnya diinkubasi selama 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 1000 µL 200 mM natrium karbonat. p-Nitrofenol yang dihasilkan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada 400 nm. Pada uji larutan kontrol, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim (Tabel 3.2).

**Tabel 3.2** Prosedur Optimasi Konsentrasi Substrat PNPG dengan volume total 1,5 mL

Reagen	Volume (µL)	
	Uji	Kontrol
DMSO	5	5
Dapar fosfat (pH 6,8)	245	245
pNPG (konsentrasi 30/ 20/ 15/ 10/ 5/ 2,5/ 2/ 1 mM)	125	125
<b>Inkubasi 37°C, 5 menit</b>		
Enzim (0,15 U/mL)	125	-
Natrium karbonat 200 mM	-	1000
<b>Inkubasi 37°C, 15 menit</b>		
Enzim (0,15 U/mL)	-	125
Natrium karbonat 200 mM	1000	-
<b>Ukur absorbansi pada 400 nm</b>		

#### 3.4.4.3 Penentuan Optimasi pH

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 5 µL dimetil sulfoksida (DMSO), 245 µL dapar fosfat (pH 6,6/6,8/7,0) dan 125 µL p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) 5 mM, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Untuk larutan uji, ditambahkan 125 µL larutan enzim selanjutnya diinkubasi selama 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 1000 µL 200 mM natrium karbonat. p-Nitrofenol yang dihasilkan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada 400 nm. Pada uji larutan kontrol, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim (Tabel 3.3).

**Tabel 3.3** Prosedur Optimasi pH dengan volume total masing-masing 1,5 mL

Reagen	Volume ( $\mu\text{L}$ )					
	U <sub>1</sub>	K <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>	K <sub>2</sub>	U <sub>3</sub>	K <sub>3</sub>
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
pNPG (5 mM)	125	125	125	125	125	125
<b>Inkubasi 37°C, 5 menit</b>						
Enzim (0,15 U/mL)	125	-	125	-	125	-
Natrium karbonat 200 Mm	-	1000	-	1000	-	1000
<b>Inkubasi 37°C, 15 menit</b>						
Enzim (0,15 U/mL)	-	125	-	125	-	125
Natrium karbonat 200 Mm	1000	-	1000	-	1000	-
<b>Ukur absorbansi pada 400 nm</b>						

Keterangan:

U<sub>1</sub>= larutan uji dengan dapar fosfat pH (6,6), K<sub>1</sub>= larutan kontrol dengan dapar fosfat pH (6,6), U<sub>2</sub>= larutan uji dengan dapar fosfat pH (6,8), K<sub>2</sub>= larutan kontrol dengan dapar fosfat pH (6,8), U<sub>3</sub>= larutan uji dengan dapar fosfat pH (7,0), K<sub>3</sub>= larutan kontrol dengan dapar fosfat pH (7,0).

#### 3.4.4.4 Penentuan Optimasi Suhu Inkubasi

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 5  $\mu\text{L}$  dimetil sulfoksida (DMSO), 245  $\mu\text{L}$  dapar fosfat dengan pH 6,8 dan 125  $\mu\text{L}$  5 mM p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG), lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 30/37/40°C. Larutan uji ditambahkan 125  $\mu\text{L}$  larutan enzim selanjutnya diinkubasi selama masing-masing 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 1000  $\mu\text{L}$  200 mM natrium karbonat. p-Nitrofenol yang dihasilkan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada 400 nm. Pada uji larutan kontrol, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim (Tabel 3.4).

**Tabel 3.4.** Prosedur Optimasi Suhu Inkubasi dengan volume total 1,5 mL

Reagen	Volume (µL)	
	Uji	Kontrol
DMSO	5	5
Dapar fosfat (pH 6,8)	245	245
PNPG (5 mM)	125	125
<b>Inkubasi 30/37/40°C, 5 menit</b>		
Enzim (0,15 U/mL)	125	-
Natrium karbonat 200 mM	-	1000
<b>Inkubasi 30/37/40°C, 15 menit</b>		
Enzim (0,15 U/mL)	-	125
Natrium karbonat 200 mM	1000	-
<b>Ukur absorbansi pada 400 nm</b>		

### 3.4.5 Perhitungan Aktivitas Enzim (Sigma, 1996)

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

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

#### Keterangan :

- V = Volume total (mL)      V<sub>e</sub> = Volume enzim (mL)  
df = faktor pengenceran      t = Waktu inkubasi (menit)  
18.3 = Ekstinsi milimolar p-nitrofenol pada 400 nm  
C = Banyaknya α-glukosidase dalam larutan (mg/mL)

#### Definisi Unit: (Sigma, 1996)

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

### 3.4.6 Penentuan Penghambatan Aktivitas α-Glukosidase

Uji penghambatan aktivitas α-glukosidase dilakukan sesuai dengan kondisi optimasi yang diperoleh. Prosedur uji penghambatan aktivitas α-glukosidase dapat dilihat pada Lampiran 4.

#### **3.4.6.1 Pengujian Blanko**

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

#### **3.4.6.2 Pengujian Kontrol Blanko**

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

#### **3.4.6.3 Pengujian Sampel**

Sebanyak 5  $\mu\text{L}$  larutan sampel (ekstrak) ditambah dengan 245  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pH 6,8 dan 125  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) 5 mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 125  $\mu\text{L}$  larutan enzim dan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 1000  $\mu\text{L}$  200 mM natrium karbonat. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada 400 nm. Pengujian dilakukan sebanyak dua kali. Persentase inhibisi setiap konsentrasi ekstrak dihitung kemudian dihitung pula  $\text{IC}_{50}$ -nya.

#### **3.4.6.4 Pengujian Kontrol Sampel**

Sebanyak 5  $\mu\text{L}$  larutan sampel (ekstrak) ditambah dengan 245  $\mu\text{L}$  dapar fosfat pH 6,8 dan 125  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) 5 mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 1000  $\mu\text{L}$  200

mM natrium karbonat dan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 125µL larutan enzim. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada 400 nm. Pengujian dilakukan sebanyak dua kali.

#### 3.4.6.5 Pengujian Standar/Pembandingan

Sebanyak 5 µL larutan standar (akarbose dan kuersetin) ditambah dengan 245 µL dapar fosfat pH 6,8 dan 125 µL p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) 5 mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian 125 µL larutan enzim ditambahkan, lalu diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 1000 µL 200 mM natrium karbonat. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada 400 nm. Pengujian dilakukan sebanyak dua kali. Persentase inhibisi setiap konsentrasi akarbose dan kuersetin dihitung kemudian dihitung pula IC<sub>50</sub>-nya.

#### 3.4.6.6 Pengujian Kontrol Standar/Pembandingan

Sebanyak 5 µL larutan standar (akarbose dan kuersetin) ditambah dengan 245 µL dapar fosfat pH 6,8 dan 125 µL p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) 5 mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 1000 µL 200 mM natrium karbonat dan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 125µL larutan enzim. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada 400 nm. Pengujian dilakukan sebanyak dua kali.

**Tabel 3.5** Prosedur Uji Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase dengan volume total masing-masing 1,5 mL

Reagen	Volume (µL)			
	B <sub>1</sub>	B <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>0</sub>
<b>Sampel / standar</b>	-	-	5	5
<b>DMSO</b>	5	5	-	-
<b>Dapar fosfat (6,8)</b>	245	245	245	245
<b>PNPG (5 mM)</b>	125	125	125	125

**Tabel 3.5** (Lanjutan)

Inkubasi pada 37°C, 5 menit				
<b>Enzim (0,15 U/mL)</b>	125	-	125	-
<b>Natrium karbonat</b>	-	1000	-	1000
Inkubasi pada 37°C, 15 menit				
<b>Enzim (0,15 U/mL)</b>	-	125	-	125
<b>Natrium karbonat</b>	1000	-	1000	-
Ukur absorbansi pada 400 nm				

Keterangan : B<sub>1</sub>= Blanko, B<sub>0</sub>= Kontrol Blanko, S<sub>1</sub>= Sampel dan Standar (akarbose dan quersetin), S<sub>0</sub>= Kontrol Sampel dan Kontrol Standar (akarbose)

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

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

Keterangan: S = absorbansi Sampel (S<sub>1</sub>-S<sub>0</sub>)

C = absorbansi Blanko (DMSO), (B<sub>1</sub>-B<sub>0</sub>)

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

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

### 3.4.7 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Ekstrak dengan aktivitas tertinggi dari hasil fraksinasi cair-cair ekstrak kulit batang buni dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom cair vakum untuk memisahkan senyawa dalam waktu yang lebih singkat dengan

menggunakan silika gel sebagai absorben dan berbagai perbandingan pelarut (elusi gradien), serta menggunakan pompa vakum untuk mempercepat penarikan eluen. Kolom kromatografi disiapkan dengan memasukkan 80 g silika gel 60 H dengan keadaan vakum agar diperoleh kerapatan maksimum. Kemudian dielusi dengan menggunakan n-heksana 100 mL. Ekstrak etil asetat ditimbang sebanyak 5,491 g, kemudian ditambahkan silika gel 60 sebanyak 5,490 g lalu dihomogenkan. Setelah itu, campuran ekstrak etil asetat dan silika gel 60 tersebut dimasukkan ke dalam kolom sambil divakum lalu diratakan. Kemudian dielusi dengan perbandingan eluen yang ditentukan (lihat Tabel 3.6).

**Tabel 3.6** Perbandingan Eluen Kromatografi Kolom

Fraksi	Heksana	Etil asetat	Metanol	Volume (mL)
1	200	0	-	200
2	190	10	-	
3	180	20	-	
4	170	30	-	
5	160	40	-	
6	150	50	-	
7	140	60	-	
8	130	70	-	
9	120	80	-	
10	100	100	-	
11	80	120	-	
12	60	140	-	
13	40	160	-	
14	20	180	-	
15	0	200	0	
16	-	190	10	
17	-	180	20	
18	-	170	30	
19	-	160	40	

**Tabel 3.6** (Lanjutan)

Fraksi	Heksana	Etil asetat	Metanol	Volume (mL)
20	-	150	50	200
21	-	140	60	
22	-	130	70	
23	-	120	80	
24	-	100	100	
25	-	80	120	
26	-	60	140	
27	-	40	160	
28	-	20	180	
29	-	0	200	

Pada tahap pemisahan dengan kromatografi kolom cair vakum diperoleh 29 fraksi kemudian fraksi-fraksi tersebut digabung berdasarkan kesamaan pola pada kromatogram KLT sehingga diperoleh fraksi gabungan. Fraksi gabungan dilakukan diuji aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan prosedur yang sama seperti pada pengujian aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase dari fraksi hasil fraksinasi cair-cair kemudian dihitung nilai % inhibisi dan  $IC_{50}$ , serta dilakukan pula penapisan fitokimia pada fraksi teraktif.

#### 3.4.8 Penentuan Kinetika Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase

Penentuan kinetika penghambatan enzim dilakukan pada fraksi yang memiliki  $IC_{50}$  terkecil. Penentuan kinetika penghambatan enzim diukur dengan meningkatkan konsentrasi PNPG sebagai substrat dengan lima konsentrasi berbeda yaitu 15; 10; 5; 2,5; dan 1,25 mM. Jenis penghambatan ditentukan dengan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk plot untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten (Dewi et al., 2007). Tetapan kinetika Michaelis-Menten ( $K_m$ ) dihitung berdasarkan persamaan regresi  $y = a + b x$ , dimana  $x$  adalah jumlah substrat  $1/[S]$  dan  $y$  adalah  $1/A$ .



$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3.5)$$

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

$$y = a + b(-1/K_M) \rightarrow K_M = b/a \quad (3.6)$$

**Tabel 3.7** Prosedur Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim dengan volume total masing-masing 1,5 mL

Reagen	Volume ( $\mu$ L)	
	Tanpa Inhibitor	Dengan Inhibitor
Ekstrak	-	5
DMSO	5	-
Dapar fosfat (pH 6,8)	245	245
PNPG (15; 10; 5; 2,5; dan 1,25 mM)	125	125

**Tabel 3.7** (Lanjutan)

Inkubasi pada 37°C selama 5 menit		
Enzim (0,15 U/mL)	125	125
Inkubasi pada 37°C selama 15 menit		
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1000	1000
Ukur absorbansi pada 400 nm		

### 3.4.9 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia

Fraksi teraktif dari hasil fraksinasi cair-cair dan fraksi kolom dilakukan identifikasi komponen-komponen yang terkandung didalamnya yang diduga berpotensi menghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase. Dilakukan pula identifikasi golongan senyawa kimia pada ekstrak etanol 80%. Identifikasi golongan senyawa kimia dilakukan dengan menggunakan pereaksi kimia dan deteksi dengan penampak bercak. Untuk pendeteksian dengan KLT, larutan uji dibuat dengan menimbang ekstrak kental etanol 80%, ekstrak etil asetat, dan fraksi G, masing-masing sebanyak 14,6 mg lalu dilarutkan dalam pelarutnya.

#### **3.4.9.1 Identifikasi alkaloid (Wagner & Blatt, 1996; Farnsworth, 1966)**

Ekstrak etanol 80% sebanyak 15 mg ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air, dipanaskan di penangas air selama 2 menit, didinginkan. Kemudian disaring dan ditampung filtratnya. Filtrat tersebut digunakan sebagai larutan uji.

- a. 1 mL filtrat, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes Pereaksi Bouchardat, terbentuk endapan coklat / hitam (positif alkaloid).
- b. 1 mL filtrat, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes Pereaksi Mayer, terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol (positif alkaloid).
- c. 1 mL filtrat, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes Pereaksi Dragendorff, terbentuk endapan jingga coklat (positif alkaloid).

Pendeteksian dengan penampak bercak dilakukan dengan menotolkan larutan ekstrak etanol 80%, etil asetat, dan fraksi G pada lempeng silika gel lalu dielusi dengan kloroform : metanol (17:3). Jika spot divisualisasi dengan Dragendorff berwarna merah jingga maka menunjukkan adanya alkaloid. Dilakukan pula pengujian pada *Chinae Korteks* sebagai kontrol positif.

#### **3.4.9.2 Identifikasi flavonoid (Wagner & Blatt, 1996)**

Larutan ekstrak etanol 80%, etil asetat, dan fraksi G ditotolkan pada lempeng silika gel lalu dielusi dengan kloroform : metanol (17:3). Deteksi adanya flavonoid dengan menggunakan penampak bercak  $\text{AlCl}_3$  0,5%. Flavonoid akan berfluoresensi kuning pada UV 365 nm. Dilakukan pula pengujian pada *Orthosiphonis Folium* sebagai kontrol positif.

#### **3.4.9.3 Identifikasi sterol/terpen (Wagner & Blatt, 1996)**

Larutan ekstrak etanol 80%, etil asetat, dan fraksi G ditotolkan pada lempeng silika gel lalu dielusi dengan n-heksana : etil asetat (9:1). Deteksi adanya terpen dengan menggunakan penampak bercak vanillin-asam sulfat. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya bercak warna biru-ungu. Dilakukan pula pengujian pada *Caryophylli Flos* sebagai kontrol positif.

#### **3.4.9.4 Identifikasi tanin (Farnsworth, 1966)**

Identifikasi tanin dilakukan dengan menimbang ekstrak etanol 80%, fraksi etil asetat dan fraksi G sebanyak 13 mg ditambahkan 15 mL air panas. Kemudian panaskan hingga mendidih selama 5 menit. Filtrat disaring. Filtrat sebanyak 1 ml ditambahkan 3 ml gelatin 10% membentuk endapan putih (positif tanin). Dilakukan pula pengujian pada *Theae Folium* sebagai kontrol positif.

#### **3.4.9.5 Identifikasi saponin (Depkes, 1995b)**

Ekstrak kental etanol 80% sebanyak 15 mg ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, lalu didiamkan selama 10 menit. Terbentuk buih yang mantap setinggi 1 hingga 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang. Dilakukan pula pengujian pada *Liquiritiae Radix* sebagai kontrol positif.

#### **3.4.9.6 Identifikasi gula (Depkes, 1995b)**

Ekstrak etanol 80%, fraksi etil asetat, dan fraksi G, masing-masing sebanyak 12 mg dilarutkan dalam 5 mL pelarutnya. Kemudian ditambahkan 5 tetes Molisch LP lalu ditambahkan dengan hati-hati 2 mL asam sulfat P. Hasil positif terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan (Reaksi Molisch). Dilakukan pula pengujian pada *Nerii Folium* sebagai kontrol positif.

#### **3.4.9.7 Identifikasi kuinon dan antrakuinon (Wagner & Bladt, 1996)**

Larutan ekstrak etanol 80%, etil asetat, dan fraksi G ditotolkan pada lempeng silika gel lalu dielusi dengan etil asetat : metanol : akuades (100:17:13). Deteksi adanya antrakuinon dengan menggunakan penampak bercak KOH. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya bercak warna merah. Dilakukan pula pengujian pada *Rhei Radix* sebagai kontrol positif.

## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Penyiapan Bahan Uji

Bahan simplisia uji yang digunakan berasal dari famili Euphorbiaceae, yaitu kulit batang buni (*Antidesma bunius* L.) yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor dan telah diidentifikasi oleh Pusat Konservasi Tumbuhan-Kebun Raya Bogor, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Determinasi tanaman dilakukan pada *Antidesma bunius* untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan adalah benar-benar tanaman *Antidesma bunius*. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 8.

Simplisia kulit batang *Antidesma bunius* dipilih karena merupakan salah satu simplisia yang memiliki aktivitas tinggi dalam menghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan  $IC_{50}$  3,90  $\mu$ g/mL (Elya, Basah, Mun'im, Yuliasuti, Bangun, & Kurnia, 2012). Simplisia yang diambil merupakan kulit batang yang berasal dari ranting dengan diameter 1-3 cm dan berwarna coklat. Kulit batang yang digunakan terlebih dahulu disortasi basah kemudian dibersihkan dari debu dan tanah dengan dicuci air hingga bersih kemudian ditiriskan dan ditimbang bobot sebelum dikeringkan. Selanjutnya, dilakukan pengeringan yang bertujuan untuk mengurangi kandungan air dan menghentikan reaksi enzimatik yang dapat mengurangi atau merusak bahan aktif (Samuelsson, 1999). Pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan dalam ruangan ber-AC selama 14 hari. Untuk memastikan pengeringan, simplisia kulit batang buni dimasukkan ke dalam oven pada suhu 60°C selama 6 jam. Simplisia yang sudah kering, selanjutnya ditimbang kembali sehingga dapat diketahui bobot penyusutannya. Persentase penyusutan bobot simplisia kulit batang buni setelah dikeringkan dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Simplisia yang telah kering disortasi kembali dari pengotor-pengotor yang tertinggal. Simplisia yang sudah disortir, digiling dengan menggunakan mesin penggiling hingga menjadi serbuk. Untuk mencegah kerusakan dan kemunduran mutu, serbuk simplisia disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya (Samuelsson, 1999).

#### 4.2. Ekstraksi Simplisia

Serbuk simplisia sebanyak 590,4 g diekstraksi dengan cara panas, yaitu refluks dengan pelarut etanol 80 %. Cara refluks dipilih berdasarkan penelitian yang membuktikan bahwa dengan dilakukan refluks, ekstrak etanol 80% kulit batang *Antidesma bunius* memiliki aktivitas tinggi dalam menghambat  $\alpha$ -glukosidase dengan  $IC_{50}$  3,9 ppm sehingga dapat disimpulkan golongan senyawa yang diuji tahan terhadap pemanasan (Elya, Basah, Mun'im, Yuliasuti, Bangun, & Kurnia, 2012). Keuntungan lain dari cara refluks yaitu tidak membutuhkan waktu yang lama.

Cairan pelarut yang digunakan dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang dapat menarik senyawa berkhasiat secara optimal, yaitu air, alkohol (etanol) serta campurannya (Depkes RI, 2000). Etanol dipilih karena dapat menginaktivasi enzim fenolase yang dapat mengoksidasi beberapa senyawa golongan fenol yang peka terhadap oksidasi enzim (Harborne, 1987). Beberapa golongan senyawa fenol, flavonoid dan glikosida diketahui merupakan penghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase (Jung, Park, Chul, Kang, Seok-Kang, & Ki-Kim, 2006) sehingga digunakan etanol untuk menjaga ketersediaan kandungan kimia tersebut. Etanol seringkali dicampur dengan air karena dapat menginduksi *swelling* partikel-partikel tanaman dan meningkatkan porositas dinding sel yang memfasilitasi difusi kandungan kimia yang terekstraksi dari dalam sel ke dalam pelarut. Perbandingan etanol dan air yang ideal digunakan untuk ekstraksi pada kulit batang adalah 7:3 dan 8:2 (Samuelsson, 1999). Perbandingan 8:2 atau etanol 80% dipilih karena lebih mudah menguap dan mengacu pada penelitian sebelumnya (Elya, Basah, Mun'im, Yuliasuti, Bangun, & Kurnia, 2012).

Refluks dilakukan selama satu jam. Hasil ekstraksi disaring kemudian ampasnya diekstraksi kembali hingga tiga kali agar jumlah senyawa yang tersari lebih banyak. Filtrat yang diperoleh ditampung dan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental. Selanjutnya, ekstrak kental ditimbang untuk menghitung persen rendemen kemudian disimpan dalam lemari pendingin suhu 4°C untuk mencegah tumbuhnya mikroba yang tidak diinginkan (Depkes RI, 1985). Hasil ekstraksi dan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.2.

### 4.3. Fraksinasi

Ekstrak kental etanol sebanyak 128,8 g difraksinasi dengan pelarut yang kepolarannya semakin meningkat dimulai dari pelarut nonpolar hingga pelarut polar yaitu heksana, etil asetat, dan metanol. Hal ini bertujuan untuk memisahkan golongan senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman berdasarkan tingkat kepolarannya sehingga diperoleh senyawa aktif yang diduga memiliki aktivitas penghambatan terhadap  $\alpha$ -glukosidase. Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi menggunakan corong pisah.

Ekstrak kental etanol didispersikan dengan air panas terlebih dahulu, kemudian dipartisi dengan pelarut heksana, dikocok kuat, lalu didiamkan hingga terbentuk dua lapisan dengan lapisan air yang berada di bagian bawah dan lapisan heksana di bagian atas. Lapisan heksana dipisahkan, kemudian diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh fraksi heksana kental. Lapisan air difraksinasi kembali dengan cara yang sama menggunakan pelarut etil asetat hingga diperoleh fraksi etil asetat kental dan lapisan air. Lapisan air yang terakhir diperoleh dikeringkan menggunakan *freeze dry*. Serbuk yang dihasilkan kemudian ditambah metanol 5 mL kemudian diuapkan menggunakan *vacuum pump* hingga diperoleh fraksi metanol kental. Fraksi heksana, etil asetat, dan metanol kental yang diperoleh kemudian ditimbang dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C. Nilai rendemen fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.3.

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

Pada tahap pendahuluan dilakukan penetapan panjang gelombang p-nitrofenol, penetapan konsentrasi optimum substrat, dan penetapan pH optimum dan suhu optimum yang sesuai dengan kondisi analisis yang digunakan sehingga enzim dapat bekerja secara optimal.

#### 4.4.1. Penetapan Panjang Gelombang p-nitrofenol

Prinsip uji aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase yaitu substrat PNPG (p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida) akan didegradasi oleh  $\alpha$ -glukosidase menjadi p-nitrofenol dan glukosa. p-nitrofenol yang dihasilkan, pada pH 5,6-7,6 akan menjadi bentuk anion p-nitrofenoksida yang berwarna kuning yang diabsorpsi

secara kuat pada panjang gelombang 405-410 nm dengan menggunakan spektrofotometer (Mc.Pherson dan Pincus, 2011; Bassett, Denney, Jeffery, & Mendham, 1994). Oleh karena itu, perlu ditetapkan terlebih dahulu panjang gelombang p-nitrofenol yang terbaca pada spektrofotometer yang digunakan.

Unit larutan enzim dan konsentrasi substrat yang digunakan pada penetapan panjang gelombang p-nitrofenol ini sesuai dengan yang tertera pada *Product Information Sigma*, yaitu 0,15 U/mL dan 10 mM (Sigma, 1996). Hasil pengukuran p-nitrofenol yang dihasilkan dapat terdeteksi oleh spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm (lihat Gambar 4.1). Hal ini sesuai dengan yang tertera pada *Product Information Sigma*. (Sigma, 1996)



**Gambar 4.1 Spektrum Serapan p-nitrofenol dengan Unit Larutan Enzim 0,15 U/mL; Konsentrasi PNPG 10 mM; pH 6,8; dan suhu 37<sup>0</sup>C**

#### 4.4.2. Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Konsentrasi PNPG

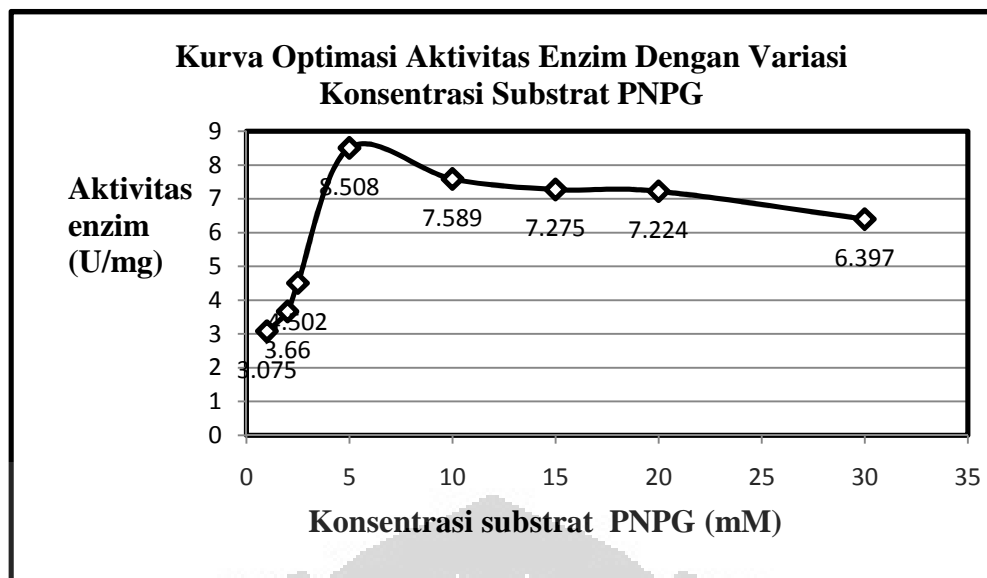
Optimasi aktivitas enzimatis dilakukan terhadap variasi konsentrasi substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida sehingga didapatkan konsentrasi substrat yang optimum untuk unit larutan enzim sebesar 0,15 U/mL. Substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida dan dapar fosfat (pH 6,8) diinkubasi pada 37<sup>0</sup>C selama 5 menit, kemudian ditambahkan larutan enzim  $\alpha$ -glukosidase 0,15 U/mL

dan diinkubasi kembali selama 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan natrium karbonat (Sigma, 1996).  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dipilih sebagai penghenti reaksi sebab mampu meningkatkan pH larutan uji menjadi basa sehingga enzim akan terdenaturasi. Produk yang dihasilkan dari reaksi enzimatik ini diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah ditetapkan sebelumnya, yaitu 400 nm.

Pengujian kontrol blanko untuk mengoreksi apakah masih ada produk yang terbentuk pada reaksi antara PNPG dan  $\alpha$ -glukosidase saat kondisi campuran telah dibasakan terlebih dahulu dengan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Oleh karena itu, pengamatan dilakukan dengan menukar posisi antara enzim  $\alpha$ -glukosidase dan natrium karbonat. Pada kontrol, natrium karbonat ditambahkan setelah inkubasi substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida dan dapar fosfat (pH 6,8). Setelah diinkubasi selama 15 menit, ditambahkan  $\alpha$ -glukosidase pada campuran reaksi tersebut.

Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 1; 2; 2,5; 5; 10; 15; 20; dan 30 mM (lihat pada Tabel 4.4). Konsentrasi substrat ditingkatkan, sementara semua kondisi lain dipertahankan tetap konstan, kecepatan awal yang terukur akan meningkat hingga mencapai nilai maksimum hingga mencapai suatu keadaan yang sudah dapat dikatakan enzim jenuh oleh substrat (Murray, Bender, Botham, Kennelly, Rodwell, & Weil, 2009). Hasil yang diperoleh menunjukkan terdapat kenaikan absorbansi dari konsentrasi substrat 1 hingga 5 mM, dan terjadi penurunan absorbansi pada konsentrasi substrat 10 mM (lihat Gambar 4.2) sehingga ditafsirkan enzim telah jenuh oleh substrat pada konsentrasi substrat 5 mM. Penurunan absorbansi ini terjadi karena terbentuknya produk inhibitor dari reaksi enzim. Produk inhibitor tersebut adalah  $\alpha$ -D-glukopiranosida yang memiliki kemiripan struktur dengan substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida yaitu analog karbohidrat sehingga mungkin terjadi kompetisi antara senyawa-senyawa tersebut dalam menempati sisi aktif enzim sehingga absorbansi yang dihasilkan menurun. Pernyataan ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan Yao, Mauldin, dan Byers bahwa glukosa dapat menghambat  $\alpha$ -glukosidase secara kompetitif. Dengan demikian, untuk uji aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase 0,15 U/ml dapat digunakan konsentrasi substrat 5 mM.



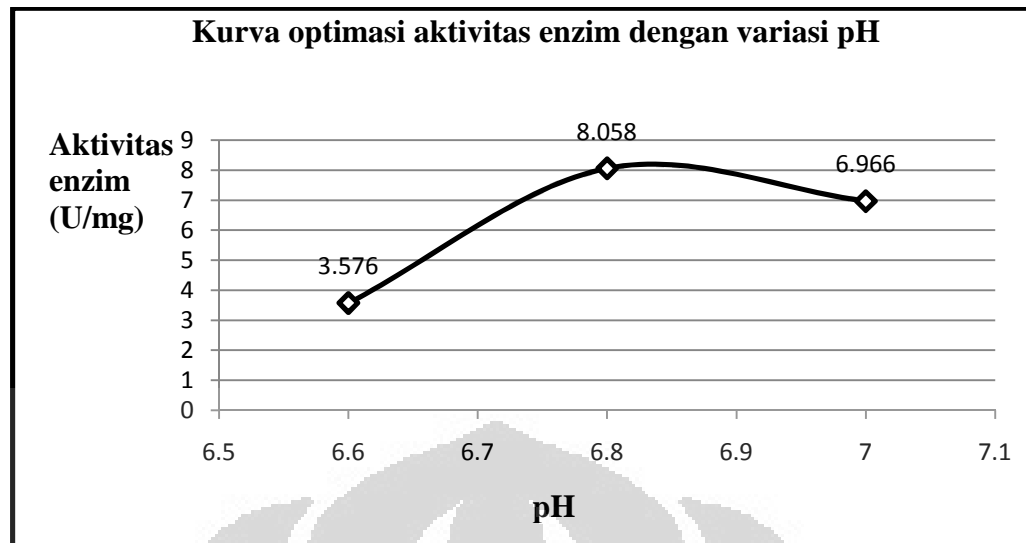


**Gambar 4.2. Kurva optimasi aktivitas enzim dengan variasi konsentrasi substrat PNPG 1 hingga 30 mM**

#### 4.4.3. Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi pH

Optimasi aktivitas enzimatis dilakukan pula terhadap variasi pH, yaitu pH 6,6; 6,8; 7,0; dan 7,2 (lihat pada Tabel 4.5). Hal ini didasarkan pada beragamnya pH dapar fosfat yang digunakan untuk pengujian penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase. Beberapa penelitian menggunakan dapar fosfat pH 7,0 (Hartati, Elya, & Najib, 2010; Dewi, *et al.*, 2007; Lee, *et al.*, 2007; Hwang, *et al.*, 2011) dan ada pula yang menggunakan dapar fosfat pH 6,8 untuk pengujian penghambatan aktivitas enzim (Shihabudeen, Priscilla, & Thirumurugan, 2011; Kang, Song, & Zhang, 2011; Elya, Basah, Mun'im, Yuliasuti, Bangun, & Kurnia, 2012; Sigma, 1996). Optimasi ini perlu dilakukan untuk menentukan pH optimum yang sesuai untuk pengujian penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase.

Hasil dari optimasi pH ini, awalnya, didapatkan peningkatan absorbansi pada pH 6,6; 6,8; dan 7,0 berturut-turut, yaitu 0,3616; 0,6930; dan 1,0650. Pengujian pada pH 7,0 diperlukan pengenceran 50% karena absorbansinya melebihi batas range 0,2-0,8. Setelah dilakukan pengenceran, didapatkan penurunan absorbansi pada pH 7,0, yaitu 0,3117. Dengan demikian, berdasarkan pengukuran terakhir, pH 6,8 merupakan pH yang menghasilkan aktivitas enzim maksimal ((lihat pada Gambar 4.3).

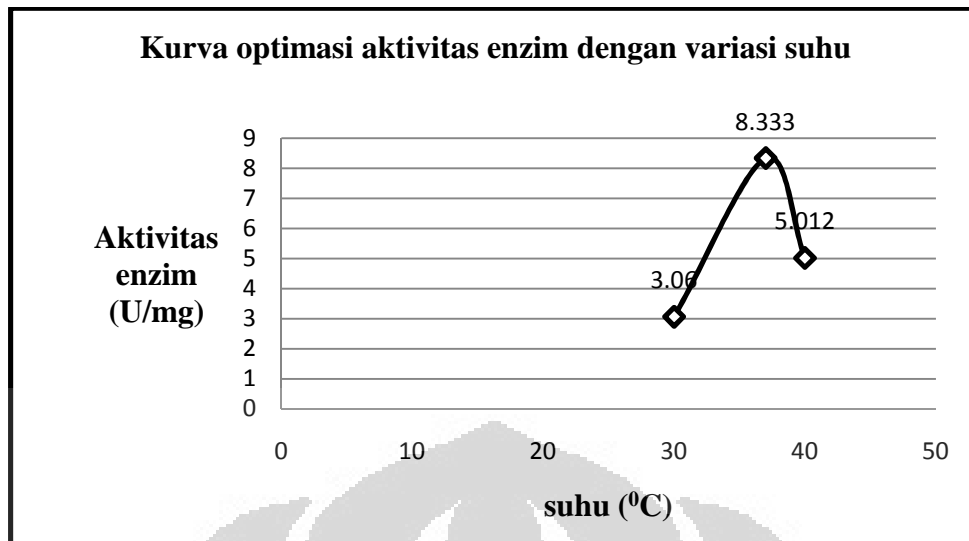


**Gambar 4.3 Kurva optimasi aktivitas enzim dengan variasi pH 6,6; 6,8; dan 7,0**

#### 4.4.4. Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Suhu

Optimasi aktivitas enzimatis terhadap variasi suhu dilakukan untuk memastikan bahwa suhu  $37^{\circ}\text{C}$  merupakan suhu optimum bagi kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase (Sigma, 1996). Variasi suhu yang digunakan dalam optimasi ini, yaitu suhu  $30^{\circ}$ ,  $37^{\circ}$ , dan  $40^{\circ}$  C (lihat Tabel 4.6). Pemilihan suhu  $30^{\circ}\text{C}$  didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Tadera, Minami, Takamatsu, dan Matsuoka pada tahun 2006. Dalam melakukan optimasi suhu, digunakan *circulating waterbath* untuk menginkubasi campuran reaksi. *Circulating waterbath* mampu mendistribusikan panas secara homogen dan memberikan kontrol suhu yang akurat, yaitu  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$  (Mc.Pherson & Pincus, 2011).

Hasil dari optimasi suhu ini, didapatkan peningkatan aktivitas enzim pada suhu  $30^{\circ}$  dan  $37^{\circ}\text{C}$  berturut-turut, yaitu 3,06 dan 8,33 U/mg. Peningkatan aktivitas ini merupakan akibat dari peningkatan energi kinetik pada molekul-molekul yang bereaksi. Kemudian terjadi penurunan aktivitas pada suhu  $40^{\circ}\text{C}$ , yaitu 5,012 U/mg (lihat pada Gambar 4.4). Dengan demikian, berdasarkan pengukuran terakhir, suhu  $37^{\circ}\text{C}$  merupakan suhu optimum aktivitas enzim dan hal ini sesuai dengan yang tertera pada *Product Information Sigma* (Sigma, 1996).



**Gambar 4.4 Kurva optimasi aktivitas enzim dengan variasi suhu 30, 37, dan 40° C**

#### 4.5. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim $\alpha$ -Glukosidase

Sebuah penelitian membuktikan bahwa ekstrak etanol 80% dari kulit batang *Antidesma bunius* memiliki aktivitas penghambat  $\alpha$ -glukosidase dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 3,90 (Elya, Katrin, Mun'im, Yuliasuti, Bangun, & Kurnia, 2012). Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka selanjutnya dilakukan uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dari fraksi ekstrak etanol 80% kulit batang buni, yaitu fraksi n-heksana, etil asetat, dan metanol. Masing-masing fraksi dibuat dalam berbagai konsentrasi ekstrak, yaitu 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; dan 0,03125%. Variasi konsentrasi ini dibuat untuk melihat pengaruh penambahan konsentrasi ekstrak terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase. Hasil uji aktivitas penghambatan dari berbagai konsentrasi tersebut diperlukan untuk membuat persamaan regresi yang digunakan dalam perhitungan  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  inilah yang ditetapkan sebagai nilai penghambatan.  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi yang dapat menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian (Murray, Bender, Botham, Kennelly, Rodwell, & Weil, 2009).

Dalam pengujian penghambatan aktivitas enzim, nilai absorbansi sampel (S) dibandingkan dengan blanko (B). Larutan sampel (S) adalah larutan ekstrak, akarbose (standar I), atau kuersetin (standar II) yang merupakan agen penghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase. Sedangkan, larutan blanko (B) adalah larutan uji tanpa

sampel dengan perlakuan yang sama dengan larutan uji sampel. Pengujian larutan kontrol, baik kontrol sampel maupun kontrol blanko, dilakukan sebagai faktor koreksi. Kontrol sampel ( $S_0$ ) perlakuannya sama dengan kontrol blanko yaitu dengan menukar posisi penambahan enzim dan natrium karbonat, hanya saja dilakukan dengan penambahan sampel.

Dalam pengujian penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase terlebih dahulu dilakukan uji terhadap pembanding/standar, yaitu akarbose dan kuersetin. Hal ini bertujuan untuk mengetahui apakah fraksi ekstrak merupakan fraksi aktif dengan cara membandingkan nilai  $IC_{50}$ -nya dengan  $IC_{50}$  standar. Akarbose dipilih sebagai pembanding/standar karena merupakan obat golongan penghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang mudah didapat, telah umum digunakan sebagai standar pengujian penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase. Selain itu, akarbose memiliki kemiripan struktur dengan substrat yang digunakan, karena keduanya merupakan bentuk karbohidrat. Tetapi akarbose hanya memiliki efek inhibisi yang tinggi terhadap  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari mamalia dan tidak memiliki efek inhibisi terhadap  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari *S. cerevisiae* (Kumar, S., Narwal, Kumar, V., dan Prakash, 2011). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Tadera, Minami, Takamatsu, dan Matsuoka, kuersetin dapat menghambat 91% aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari ragi (Tadera, Minami, Takamatsu, dan Matsuoka, 2006). Oleh karena itu, digunakan pula kuersetin sebagai standar kedua dikarenakan kuersetin dinilai berpotensi menghambat  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari *S. cerevisiae*.

Pada konsentrasi 2%, akarbose dapat menghambat 28,78% aktivitas enzim dalam pembentukan produk p-nitrofenol. Kekuatan inhibisinya berkurang dengan penurunan konsentrasi larutan uji akarbose, yaitu 14,93; 11,30; 9,1; 6,15; dan 5,66 % masing-masing pada konsentrasi ekstrak 66,67; 33,33; 16,67; 8,33; 4,17; dan 2,08 ppm. Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh adalah 129,75 ppm (lihat pada Tabel 4.7). Hasil ini mendekati dengan hasil pada pengujian yang dilakukan Andrade-Cetto, Becerra-Jimenez, dan Cardenas-Vazquez pada tahun 2008, yaitu 128 ppm. Begitu juga dengan penelitian sebelumnya, akarbose memiliki  $IC_{50}$  117,20 ppm (Elya, Katrin, Mun'im, Yuliasuti, Bangun, dan Septiana, 2012).

Hasil pengujian pada fraksi n-heksana, etil asetat, dan metanol diperoleh nilai  $IC_{50}$  semua fraksi tersebut lebih rendah dibandingkan dengan akardiose. Hal ini menunjukkan bahwa penghambatan aktivitas enzim oleh fraksi uji ini lebih baik daripada akardiose. Hal ini mungkin disebabkan karena ekstrak kasar mengandung beberapa senyawa aktif yang secara sinergis dan *additive* mampu menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase (Soumyanath, 2006). Jika dibandingkan dengan  $IC_{50}$  kuersetin, semua  $IC_{50}$  ekstrak uji lebih tinggi dibandingkan dengan kuersetin. Kuersetin memiliki  $IC_{50}$  3,47 menandakan bahwa kuersetin dapat menghambat  $\alpha$ -glukosidase dengan baik (lihat Tabel 4.8). Fraksi yang memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase paling tinggi adalah fraksi etil asetat dengan nilai  $IC_{50}$  5,73 ppm, sedangkan fraksi yang memiliki penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase paling rendah adalah fraksi n-heksana dengan nilai  $IC_{50}$  29,78 ppm.

Penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tertinggi oleh fraksi etil asetat disebabkan karena adanya kandungan gula, terpen, dan flavonoid. Berdasarkan literatur yang diperoleh, dilaporkan bahwa terpen dan flavonoid memiliki efek inhibisi terhadap  $\alpha$ -glukosidase (Soumyanath, 2006; Jung, *et al.*, 2006; dan Andrade-Cetto, Becerra-Jimenez, dan Cardenas-Vazquez, 2008). Begitu juga gula diketahui dapat menghambat  $\alpha$ -glukosidase secara kompetitif (Yao, Mauldin, & Byers, 2003).

Pada fraksi etil asetat konsentrasi 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125% menghasilkan % inhibisi masing-masing 54,46; 51,92; 51,37; 49,73; 47,42; dan 47,64%, sehingga nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh adalah 5,73 ppm. Data penghambatan aktivitas enzim oleh fraksi n-heksana, etil asetat, dan metanol dapat dilihat pada Tabel 4.9- 4.11.

#### **4.6. Pemisahan dengan Kromatografi Kolom**

Pemisahan ekstrak dengan kromatografi kolom dilakukan pada fraksi yang memiliki aktivitas inhibisi  $\alpha$ -glukosidase tertinggi, yaitu ekstrak etil asetat dengan  $IC_{50}$  5,73 ppm. Pemisahan dilakukan dengan kromatografi kolom vakum sehingga diperoleh 29 fraksi kemudian fraksi digabungkan berdasarkan pola kromatogram KLT. Berdasarkan pola kromatogram KLT diperoleh 10 fraksi

gabungan, yakni A, B, C, D, E, F, G, H, I, dan J. Penggabungan fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.12. Sementara, nilai rendemen fraksi gabungan kolom dapat dilihat pada Tabel 4.13.

#### 4.8. Uji Aktivitas Penghambatan Dari Fraksi Kolom

Fraksi gabungan yang telah diperoleh dilakukan uji aktivitas penghambatannya terhadap  $\alpha$ -glukosidase. Berdasarkan hasil yang diperoleh, fraksi G memiliki aktivitas inhibisi tertinggi dengan  $IC_{50}$  1,16. Data penghambatan aktivitas enzim oleh semua fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.14- 4.23.  $IC_{50}$  fraksi G yang rendah dikarenakan adanya flavonoid dan gula dalam fraksi G. Berdasarkan studi literatur, dilaporkan bahwa flavonoid merupakan inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yang sangat kuat (Wang, Du, Song, 2010). Begitu pula dengan gula, diketahui dapat menghambat  $\alpha$ -glukosidase secara kompetitif (Yao, Mauldin, & Byers, 2003).

#### 4.9. Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim $\alpha$ -Glukosidase

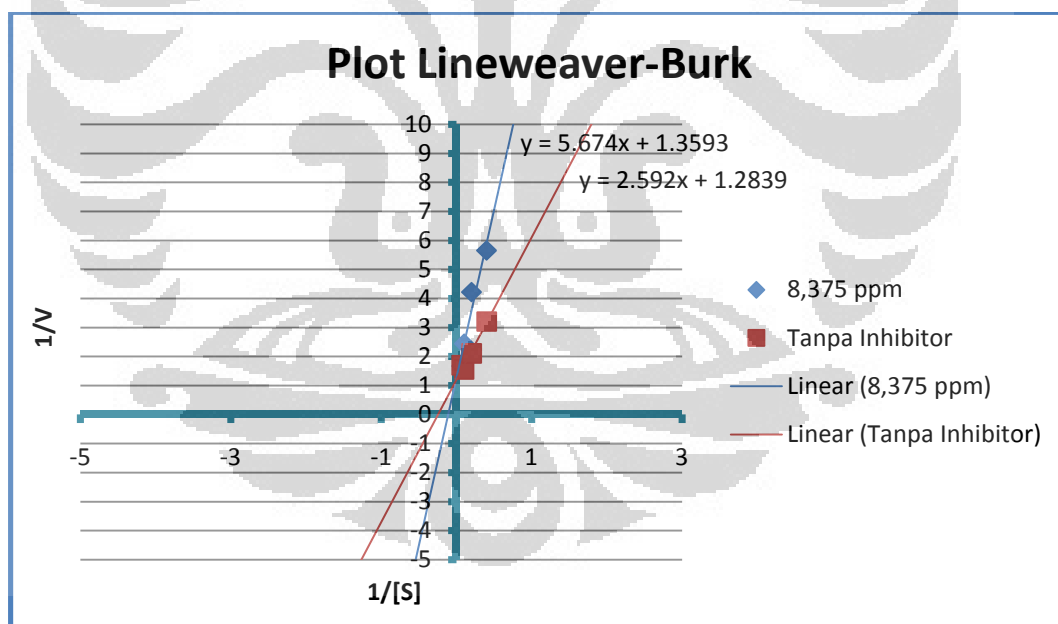
Kinetika enzim dilakukan untuk mengetahui jenis inhibisi sampel terhadap enzim. Untuk menganalisis kinetika enzim, dapat digunakan plot Lineweaver-Burk, dimana sumbu x adalah satu per konsentrasi substrat ( $1/S$ ) sedangkan sumbu y adalah satu per kecepatan reaksi enzim ( $1/V$ ). Kinetika enzim dapat diketahui dengan melihat aktivitasnya terhadap kenaikan konsentrasi substrat, dimana konsentrasi yang digunakan adalah 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, dan 15 mM.

Penghambat yang dipilih adalah fraksi etil asetat karena merupakan fraksi yang paling kecil nilai  $IC_{50}$ -nya dibandingkan fraksi uji yang lain. Konsentrasi fraksi etil asetat yang digunakan adalah 8,375 ppm.

Berdasarkan persamaan yang diperoleh, nilai  $V_{max}$  dan  $K_m$  dapat ditentukan. Pada sistem tanpa inhibitor diperoleh persamaan  $y = 1,2839 + 2,592x$  dengan nilai  $V_{max}$  0,78  $\mu\text{mol/mL}$  menit dan nilai  $K_m$  2,02  $\mu\text{mol/mL}$ . Sedangkan pada sistem dengan inhibitor 8,375 ppm diperoleh persamaan  $y = 1,3593 + 5,674x$  dengan nilai  $V_{max}$  0,74  $\mu\text{mol/mL}$  menit dan nilai  $K_m$  4,17  $\mu\text{mol/mL}$ . Hasil ini menunjukkan bahwa  $V_{max}$  pada sistem dengan inhibitor sama dengan atau

mendekati  $V_{\max}$  dengan sistem tanpa inhibitor dan ada peningkatan nilai  $K_m$ , menandakan bahwa fraksi etil asetat menghambat enzim secara kompetitif. Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten dapat dilihat pada Tabel 4.25.

Hasil plot (lihat Gambar 4.5) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat kulit batang *Antidesma bunius* memiliki titik potong sumbu y. Grafik ini menunjukkan fraksi tersebut memiliki mekanisme penghambatan kompetitif terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase. Inhibitor yang memiliki mekanisme penghambatan kompetitif memiliki struktur senyawa yang menyerupai substrat atau disebut sebagai analog substrat (Murray, Bender, Botham, Kennelly, Rodwell, & Weil, 2009). Ini sama dengan halnya akarbose yang merupakan penghambat  $\alpha$ -glukosidase dan bertindak sebagai inhibitor kompetitif karena afinitasnya yang tinggi terhadap  $\alpha$ -glukosidase (Mogensen, 2007). Pengaruh penambahan substrat terhadap aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase pada konsentrasi fraksi etil asetat dapat dilihat pada Tabel 4.24.



**Gambar 4.5. Grafik kinetika inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase pada fraksi etil asetat 0,25% (8,375 ppm)**

#### 4.10. Penapisan Fitokimia

Beberapa substansi kimia diketahui memiliki efek hipoglikemik, seperti alkaloid, glikosida, terpen, flavonoid, dan lain sebagainya (Ebadi, 2002). Oleh

karena itu, ekstrak kental etanol 80%, fraksi etil asetat, dan fraksi G diidentifikasi secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa pada ekstrak dan fraksi tersebut yang diduga memiliki efek penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase. Hasil identifikasi golongan senyawa pada ekstrak etanol 80%, fraksi etil asetat, dan fraksi G kulit batang *Antidesma bunius* (L.) Spreng dapat dilihat pada Tabel 4.26.

#### 4.10.1. Alkaloid

Hasil pengujian ekstrak kental etanol 80%, fraksi etil asetat, dan fraksi G kulit batang *Antidesma bunius* menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi tersebut tidak mengandung senyawa alkaloid. Hasil negatif palsu ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti umur tanaman, iklim, daerah tumbuh, waktu pengumpulan bahan (panen), atau kuantitas kandungan senyawa alkaloid dalam tanaman *Antidesma bunius* sangat sedikit.

#### 4.10.2. Gula

Saat glikosida terhidrolisis, molekul akan terpecah menjadi gugus glikon (gula) dan aglikon. Keduanya terhubung oleh suatu ikatan glikosidik berupa jembatan O, jembatan S, jembatan N, dan jembatan C. Jembatan antara glikon dan aglikon sangat mudah terurai oleh pengaruh asam, basa, enzim, air, dan panas. Semakin pekat kadar asam atau basa, maupun semakin panas lingkungannya, glikosida akan semakin mudah dan cepat terhidrolisis.

Identifikasi gula dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi Molisch. Reaksi positif ditandai dengan munculnya cincin ungu. Hasil identifikasi gula pada ekstrak etanol 80%, ekstrak etil asetat, dan fraksi G menunjukkan bahwa adanya kandungan gula dalam ekstrak dan fraksi tersebut.

#### 4.10.3. Flavonoid

Untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa golongan flavonoid, dilakukan pengujian dengan fluoresensi menggunakan pelarut  $AlCl_3$ . Berdasarkan Gambar 4.6, ekstrak etanol 80%, ekstrak etil asetat, dan fraksi G menunjukkan fluoresensi kuning. Hal ini menandakan adanya kandungan flavonoid.



#### **4.10.4. Terpen**

Sesuai dengan strukturnya, terpenoid pada umumnya merupakan senyawa yang larut dalam lipid dan berada dalam sitoplasma sel tumbuhan. Pada penapisan ini, dilakukan identifikasi dengan menggunakan pereaksi semprot vanilin-asam sulfat. Hasil positif berupa bercak ungu ditunjukkan pada ekstrak etanol 80% dan fraksi etil asetat, sementara fraksi G menunjukkan hasil negatif (lihat Gambar 4.7).

#### **4.10.5. Tanin**

Tanin merupakan senyawa fenol yang dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air (Harborne, 1987). Identifikasi tanin dilakukan dengan pereaksi gelatin 10%. Hasil uji menunjukkan hanya ekstrak etanol 80% saja yang memberikan endapan (positif tanin).

#### **4.10.6. Saponin**

Golongan senyawa saponin mempunyai sifat khas yang dapat digunakan sebagai dasar untuk merancang metode penapisan yang sederhana. Dalam cairan, saponin dapat membentuk busa setelah pengocokan. Metode identifikasi ini digunakan karena mudah dilakukan, cepat, dan hanya membutuhkan sedikit peralatan (Farnsworth, 1966). Berdasarkan hasil identifikasi, hanya ekstrak etanol 80% menghasilkan busa hingga 1,4 cm.

#### **4.10.7. Antrakuinon**

Antrakuinon di alam kemungkinan dalam bentuk bebas, glikosida, atau antron (bentuk tereduksi). Identifikasi dengan pereaksi semprot KOH menunjukkan bahwa pada ekstrak etanol 80%, ekstrak etil asetat, dan fraksi G tidak timbul bercak berwarna merah sehingga disimpulkan bahwa kulit batang buni tidak mengandung antrakuinon.

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh hasil sebagai berikut :

- a. Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase fraksi dari hasil fraksinasi cair-cair diperoleh fraksi etil asetat memiliki aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase tertinggi dengan  $IC_{50}$  5,73 ppm. Fraksi etil asetat kulit batang *Antidesma bunius* menginhibisi  $\alpha$ -glukosidase secara kompetitif.
- b. Hasil identifikasi fraksi teraktif hasil fraksinasi cair-cair, yaitu fraksi etil asetat, menunjukkan adanya golongan senyawa terpen, flavonoid, dan gula.
- c. Uji penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase fraksi dari hasil kromatografi kolom diperoleh fraksi G memiliki aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase tertinggi dengan  $IC_{50}$  1,16 ppm. Fraksi G adalah fraksi kolom dengan eluen etil asetat : metanol (180:20).
- d. Hasil identifikasi fraksi teraktif dari hasil kromatografi kolom, yaitu fraksi G, menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid dan gula.

#### 5.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memperoleh senyawa dari ekstrak etanol 80% kulit batang buni yang berpotensi menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase.

## DAFTAR ACUAN

- Andrade-Cetto, A., Becerra-Jiménez, J., & Cárdenas-Vázquez, R. (2008). Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 27-32
- Alexander, R., & Griffiths, J. (1993). *Basic Biochemical Methods*. New York: Wiley-Liss, 38.
- Bassett, J., Denney, R.C., Jeffery, G.H., & Mendham, J. (1994). *Buku Ajar Vogel: Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik. Terj. Vogel's Textbook of Quantitative Inorganic Analysis Including Elementary Instrumental Analysis oleh Hadyana Pudjaatmaka*. Jakarta : EGC, 280.
- Bayer. (2008). Precose (akarbose tablets). <http://www.univgraph.com/Bayer/inserts/Precose.pdf>. 3 Februari 2012, pukul 12.56.
- Campbell, M., & Farrell, S. (2008). *Biochemistry (6th ed.)*. Belmont: Brooks/Cole, 159.
- Chisholm-Burns, M. A., Wells, B. G., Schwinghammer, T. L., Malone, P. M., Kolesar, J. M., Rotschafer, J. C., & DiPiro. (2008). *Pharmacotherapy Principles and Practice*. New York: McGraw-Hill, 643-658.
- Corwin, E.J. (2001). *Buku Saku Patofisiologi. Terj. dari Handbook of Pathophysiology oleh Brahm U. Pedit*. Jakarta: EGC, 545-546.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Farmakope Indonesia edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 753-755.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995a). *Farmakope Indonesia edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1061.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995b). *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 313-337.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1-33.
- Dewi, R., Iskandar, Y., Hanafi, M., Kardono, L., Angelina, M., Dewijanti, I., et al. (2007). Inhibitory Effect of Koji *Aspergillus terreus* on alfa-Glucosidase Activity and Postprandial Hyperglycemia. *Pakistan Journal of Biological Science*, 10, 18, 3131-3135.
- DiPiro, J., Talbert, R., Yee, G., Matzke, G., Wells, B., & Posey, L. M. (2011). *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach* (8th ed.). New York: McGraw-Hill, 1333-1352.
- Ebadi, Manuchair. (2007). *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine* 2<sup>nd</sup> ed. New York : CRC Taylor & Francis, 499.
- Eisenthal, R., & Danson, M. J. (2002). *Enzyme Assays : A Practical Approach* (2nd ed.). New York: Oxford University Press, 4.
- Elya, B., Katrin, Mun'im, A., Yuliasuti, W., Bangun, A., & Kurnia S., E. (2012). Screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from some plants of apocynaceae, clusiaceae, euphorbiaceae, and rubiaceae. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-6.
- Farnsworth, N. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Science* 55(3): 226-276.
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, 220-359.
- Gritter, R, Bobbitt, J., Schwarting, A. (1991). *Pengantar Kromatografi* (ed.2). Terj. dari *Introduction to Chromatography* oleh Kosasih Padmawinata. Bandung : Penerbit ITB, 160-163.
- Gruezo. (1991). *Antidesma bunius (L.) Sprengel*.  
<http://www.proseanet.org/prohati2/browser.php?docsid=340>, 21 Januari 2012, pukul 17.00.

- Guo, L., Jiang, T., 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.
- Gunawan-Puteri, M., & Kawabata, J. (2010). Novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Macaranga tanarius* leaves. *Food Chemistry*, 123: 384-389.
- Harborne, J.B. (1987). *Metode Fitokimia. Ter. Dari Phytochemical Methods oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro*. Bandung: Penerbit ITB, 47-69; 102-109; 123; 245.
- Hartati, S., Elya, B., & Najib, A. (2010). n-Butanol fraction of *Acarus calamus* rhizome extract to inhibit the activity of  $\alpha$ -glucosidase. *Tropical Medicinal Plants*. 11 : 201-203.
- Harvey, R. A., & Ferrier, D. R. (2011). *Lippincott's Illustrated Reviews : Biochemistry (5th ed.)*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 57-61.
- Herrera, Sheanna Marie D, Panopio, Aldrix M., Pedrezuela, Hyde Joan C., Perez, Rhona F., & Dumaoal, Oliver Shane R. (2011). *Antiglycemic Effect of Bignay (Antidesma bunius) Flavonoids in Sprague-Dawley Rats*. Batangas City : Lyceum of the Philippines University.
- Hoffmann, P. 2006. *Antidesma in Malesia and Thailand*. England: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Hwang, *et al.*, 2011. Isolation and characterisation of an  $\alpha$ -glucosidase inhibitory substance from fructose-tyrosine maillard reaction products. *Food Chemistry*. 127: 122-126.
- Institute of Science National Biological. (1985). *An Alphabetical List of Plant Species Cultivated in The Hortus Botanicus Bogoriensis*. Bogor : Institute of Science National Biological, 19.
- Jones, S., Luchsinger, A. (1987). *Plant Systematics* (2 ed.). Singapura : Mc. Graw-Hill, 477-480.

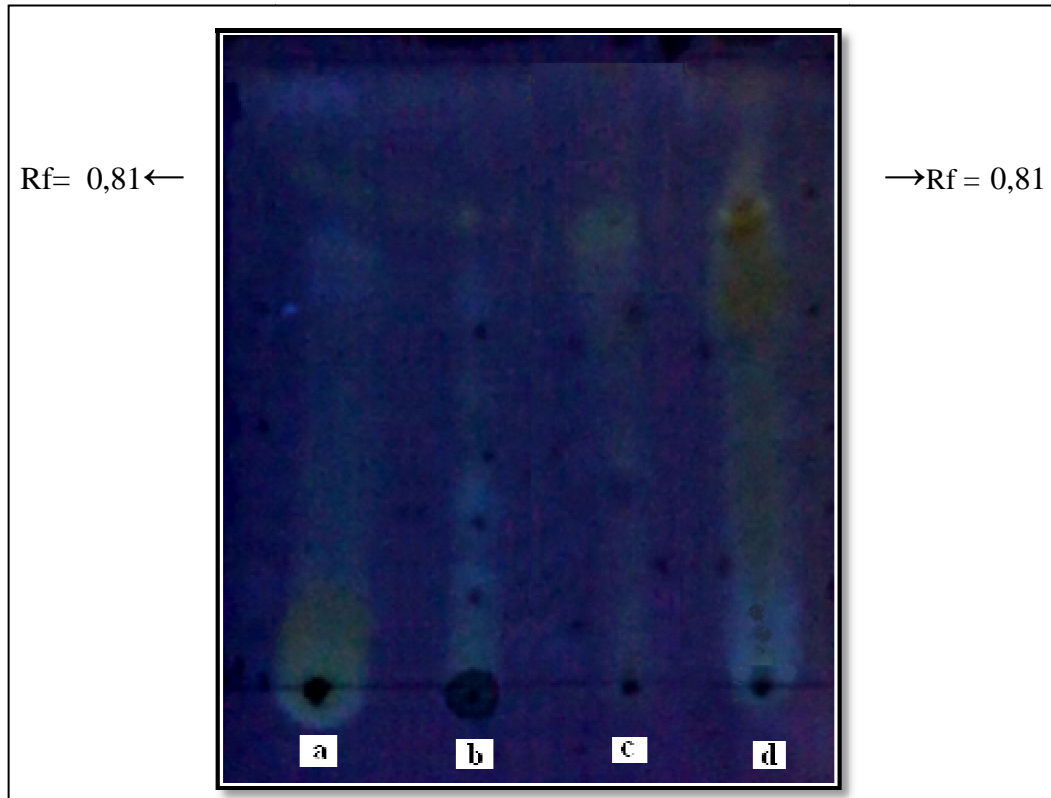
- Jung, M., Park, M., Chul, H.L., Kang, Y., Seok-Kang, E., Ki-Kim, S. (2006). Antidiabetic agents from medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry* 13: 1-16.
- Kang, W., Song, Y., & Zhang, L. (2011).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory and antioxidant properties and antidiabetic activity of *Hypericum ascyron* L. *Medicinal Chemistry Research*, 20: 809-816.
- 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. (2011).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from plants : a natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*, 5: 19-29
- Lee, S.K., Hwang, J.Y., Song, J.H., Jo, J.R., Kim, M.J., Kim, M.E., & Kim, J.I. (2007). Inhibitory activity of *Euonymus alatus* against alpha-glucosidase in vitro and in vivo. *Nutrition Research ang Practice*, 1(3): 184-188.
- LeRoith, D., Taylor, S. I., & Olefsky, J. M. (2004). *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text (3rd ed.)*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 458-460; 1154.
- LIPI. (2009). *Pengobatan Alternatif dengan Tanaman Obat*. UPT-Balai Informasi Teknologi LIPI.  
[http://www.bit.lipi.go.id/pangan-kesehatan/documents/artikel\\_hipertensi/tanaman\\_obat.pdf](http://www.bit.lipi.go.id/pangan-kesehatan/documents/artikel_hipertensi/tanaman_obat.pdf). 21 Januari 2012, pk. 17.00, 8-9.
- McPherson, R., & Pincus, M. (2011). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods (22nd ed.)*. Philadelphia: Elsevier, 438.
- Mogensen, C. E. (2007). *Pharmacotherapy of Diabetes : New Developments*. New York: Springer Science, 143.

- Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Rodwell, V., & Weil, A. (2009). *Harper's Illustrated Biochemistry (28th ed.)*. New York: McGraw-Hill, 51-71.
- Oboh, Ademiluyi, Akinyemi, Henle, Saliu, & Schwarzenbolz. (2012). Inhibitory effect of polyphenol-rich extracts of jute leaf (*Corchorus olitorius*) on key enzyme linked to type 2 diabetes ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting) in vitro. *Journal of Functional Foods*, 4: 450-458.
- Poretzky, L. (2010). *Principles of Diabetes Mellitus (2nd ed.)*. New York: Springer Science, 107-111.
- Puspitasari, E., & Ulfa, E. U. (2009). Uji sitotoksitas ekstrak metanol buah buni (*Antidesma bunius* (L) Spreng) terhadap sel Hela. *Jurnal Ilmu Dasar*, 10 (2): 181-185.
- Samuelsson, G. (1999). *Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy (4<sup>th</sup> ed.)*. Swedia: Apotekarsocieteten, 36-47.
- Shaw, J., Sicree, R., & Zimmet, P. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87: 4-14.
- Shihabudeen, M., Priscilla, H., & Thirumurugan, K., (2011). Cinnamon extract inhibits  $\alpha$ -glucosidase activity and dampens postprandial glucose excursion in diabetic rats. *Nutrition & Metabolism*, 8 (46).
- Sigma. (1996). *Enzymatic assay of  $\alpha$ -glucosidase*.  
[http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General\\_Information/alpha\\_glucosidase\\_sed.Par.0001.File.dat/alpha\\_glucosidase\\_sed.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/alpha_glucosidase_sed.Par.0001.File.dat/alpha_glucosidase_sed.pdf). 28 Februari 2012, pukul 18.00, 1-3.
- Singh, A. (2002). *A Treatise on Phytochemistry*. London : Emedia Science, 95.
- Soumyanath, A. (2006). *Traditional medicines for modern time Antidiabetic plant*. New York: Taylor & Francis Group, *preface*.

- Sudoyo, A., Setyiohadi, B., Alwi, I., Simadibrata, M., & Setiati, S. (2006). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta: Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1854-1863.
- Todera K, Minami Y, Takamatsu V. (2006). Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 52(2): 149-153.
- Touchstone, J., & Dobbins, M. F. (1983). *Practise of Thin Layer Chromatography, second edition*. New York: John Wiley & Sons, 6.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas (2<sup>nd</sup> ed)*. New york : Springer, 163-165.
- Wang, H., Du, Y., & Song, H. (2010).  $\alpha$ -Glucosidase and a-amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry*, 123: 6-13.
- Wells, B. G., DiPiro, J. T., Schwinghammer, T. L., & Hamilton, C. W. (2006). *Pharmacotherapy Handbook (6th ed.)*. New York: McGraw-Hill, 210; 212; 215-220.
- Wilson, K., & Walker, J. (2010). *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology (7th ed.)*. New York: Cambridge University Press, 581-582.
- Yao, X., Mauldin, R., Byers, L. (2003). Multiple sugar binding sites in a-glucosidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1645: 22-29.

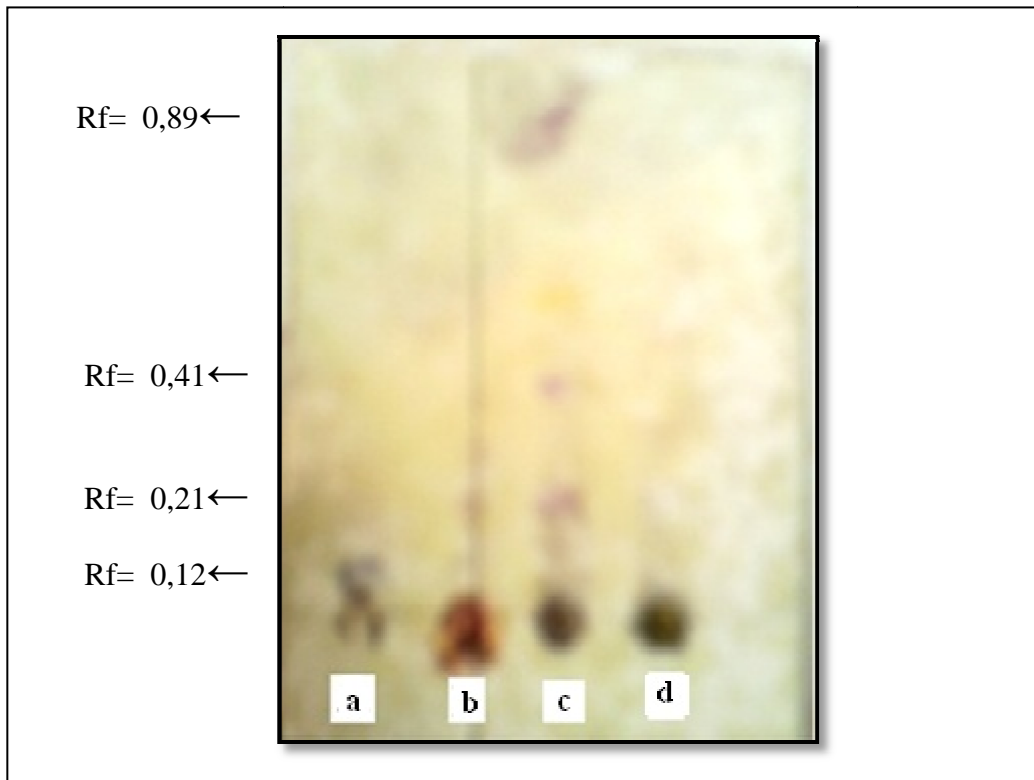


# **GAMBAR**



Keterangan : a = standar flavonoid (Orthosiphonis Folium) dengan nilai  $R_f = 0,81$ ;  
 b= ekstrak etanol 80% kulit batang buni dengan nilai  $R_f = 0,81$ ;  
 c= fraksi etil asetat kulit batang buni dengan nilai  $R_f = 0,81$ ;  
 d= fraksi G kulit batang buni dengan nilai  $R_f = 0,81$

**Gambar 4.6.** Kromatogram Flavonoid Ekstrak Etanol 80%, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi G Kulit Batang Buni dengan Eluen Kloroform : Metanol (17:3) disemprot dengan Penampak Bercak  $AlCl_3$  0,5%.



Keterangan : a = standar terpen (Caryophylli Flos) dengan nilai Rf= 0,12;  
 b= ekstrak etanol 80% kulit batang buni dengan nilai Rf= 0,21;  
 c= fraksi etil asetat kulit batang buni dengan nilai Rf= 0,21; 0,41; dan 0,89  
 d= fraksi G kulit batang buni

**Gambar 4.7.** Kromatogram Terpen Ekstrak Etanol 80%, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi G Kulit Batang Buni dengan Eluen n-Heksana : Etil Asetat (9:1) disemprot dengan Penampak Bercak Vanilin –Asam Sulfat.

# TABEL

**Tabel 4.1.** Persentase Penyusutan Bobot Simplisia Kulit Batang Buni setelah Pengeringan

<b>Simplisia Tanaman Uji</b>	<b>Bobot Basah (g)</b>	<b>Bobot Kering (g)</b>	<b>Penyusutan Bobot (%)</b>
Kulit Batang Buni ( <i>Antidesma bunius</i> )	3500	1300	62,86

Keterangan: % Penyusutan Bobot =  $\frac{\text{Bobot Basah} - \text{Bobot Kering}}{\text{Bobot Basah}} \times 100\%$

**Tabel 4.2.** Rendemen Ekstrak Etanol 80% Kulit Batang Buni

<b>Tanaman Uji</b>	<b>Bobot Simplisia (g)</b>	<b>Bobot Ekstrak Kental (g)</b>	<b>Rendemen Ekstrak (%)</b>
Kulit Batang Buni ( <i>Antidesma bunius</i> )	590,4	130	22,02

Keterangan: % Rendemen =  $\frac{\text{Bobot Ekstrak Kental}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$

**Tabel 4.3.** Rendemen Fraksi Hasil Fraksinasi Cair-cair terhadap Bobot Ekstrak Etanol 80% 128,8 g

<b>Fraksi</b>	<b>Berat (g)</b>	<b>Rendemen Fraksi (%)</b>
Fraksi Heksana	2,9336	2,28
Fraksi Etil Asetat	6,8251	5,30
Fraksi Metanol	27,2197	21,13

**Tabel 4.4.** Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Konsentrasi PNPG 1; 2; 2,5; 5; 10; 15; 20; dan 30 mM dengan Unit Larutan Enzim 0,15 U/mL, Suhu Inkubasi 37<sup>0</sup> C, dan pH 6,8

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

Keterangan: U= Larutan uji; K= Larutan kontrol; 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 4.5.** Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi pH Dapar Fosfat 6,6; 6,8; dan 7,0 dengan Unit Larutan Enzim 0,15 U/mL, Suhu Inkubasi 37<sup>0</sup> C, dan Konsentrasi PNPg 5 mM

Dapar Fosfat		Serapan (A)		Serapan rata-rata	U-K	Aktivitas Enzim	
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>			U/mL	U/mg
pH 6,60	U	0,3630	0,3602	0,3616	0,2727	0,3576	3,576
	K	0,0895	0,0883	0,0889			
pH 6,80	U	0,6917	0,6943	0,693	0,6144	0,8958	8,058
	K	0,0718	0,0854	0,0786			
pH 7,00 pengenceran 50%	U	0,3105	0,3129	0,3117	0,2656	0,3483	6,966
	K	0,0457	0,0466	0,0462		(x 2)	

Keterangan: U= Larutan Uji; K= Larutan Kontrol; 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 4.6.** Optimasi Aktivitas Enzim dengan Variasi Suhu Inkubasi 30; 37; dan 40<sup>0</sup> C dengan Unit Larutan Enzim 0,15 U/mL, Konsentrasi PNPG 5 mM dan pH 6,8

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

Keterangan: U= Larutan uji; K= Larutan kontrol; 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 4.7.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Akarbose (sebagai Pembanding I)

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>				
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			
Blanko		0,7170	0,7137	0,7154	0,6532		
Kontrol blanko		0,0625	0,0618	0,0622			
<b>Persamaan regresi</b>					5,0799 + 0,3462x		

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 Kuersetin (sebagai Pembanding II)

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>				
3,33 ppm	S <sub>1</sub>	0,3667	0,3605	0,3636	0,3128	50,24	3,47
	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			
Blanko		0,6963	0,6926	0,6945	0,6285		
Kontrol blanko		0,0665	0,0654	0,0660			
<b>Persamaan regresi</b>					0,4523 + 14,2777x		

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 n-Heksana

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>				
<b>1%</b> <b>(33,43 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,3735	0,3641	0,3688	0,3262	51,32	29,78
	S <sub>0</sub>	0,0412	0,0439	0,0426			
<b>0,5%</b> <b>(16,72 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,4403	0,4435	0,4419	0,3993	40,41	
	S <sub>0</sub>	0,0412	0,0439	0,0426			
<b>0,25 %</b> <b>(8,36 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,6069	0,6125	0,6097	0,5518	21,44	
	S <sub>0</sub>	0,0599	0,0558	0,0579			
<b>0,125%</b> <b>(4,18 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,6180	0,6342	0,6261	0,5648	15,71	
	S <sub>0</sub>	0,0608	0,0618	0,0618			
<b>0,0625%</b> <b>(2,09 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,6511	0,6477	0,6494	0,5824	13,09	
	S <sub>0</sub>	0,0664	0,0676	0,0670			
<b>0,03125%</b> <b>(1,04 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,6742	0,6917	0,6830	0,6125	8,60	
	S <sub>0</sub>	0,0703	0,0706	0,0705			
<b>Blanko</b>		0,7438	0,7452	0,7445	0,6701		
<b>Kontrol blanko</b>		0,0729	0,0758	0,0744			
<b>Persamaan regresi</b>					y = 10,3937 + 1,33x		

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 Etil Asetat

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>				
<b>1%</b> <b>(33,5 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,3224	0,3235	0,3230	0,3065	54,46	5,73
	S <sub>0</sub>	0,0143	0,0187	0,0165			
<b>0,5%</b> <b>(16,75 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,3419	0,3489	0,3454	0,3236	51,92	
	S <sub>0</sub>	0,0222	0,0213	0,0218			
<b>0,25%</b> <b>(8,375 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,0211	0,0223	0,3533	0,3273	51,37	
	S <sub>0</sub>	0,0258	0,0262	0,0260			
<b>0,125%</b> <b>(4,19 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,3698	0,3712	0,3705	0,3383	49,73	
	S <sub>0</sub>	0,0316	0,0328	0,0322			
<b>0,0625%</b> <b>(2,09 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,3750	0,3800	0,3775	0,3404	49,42	
	S <sub>0</sub>	0,0342	0,0399	0,0371			
<b>0,03125%</b> <b>(1,05 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,3899	0,3923	0,3911	0,3524	47,64	
	S <sub>0</sub>	0,0372	0,0402	0,0387			
<b>Blanko</b>		0,7137	0,7170	0,7154	0,6730		
<b>Kontrol blanko</b>		0,0421	0,0427	0,0424			
<b>Persamaan regresi</b>					$y = 48,785 + 0,1794 x$		

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

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>				
<b>1%</b> <b>(32,68 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,3627	0,3641	0,3634	0,3017	54,77	27,68
	S <sub>0</sub>	0,0623	0,0611	0,0617			
<b>0,5%</b> <b>(16,34 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,4680	0,4675	0,4678	0,3954	40,72	
	S <sub>0</sub>	0,0719	0,0728	0,0724			
<b>0,25%</b> <b>(8,17 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,4963	0,4995	0,4979	0,4124	30,85	
	S <sub>0</sub>	0,0845	0,0865	0,0855			
<b>0,125%</b> <b>(4,08 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,5096	0,5118	0,5107	0,4220	28,64	
	S <sub>0</sub>	0,0895	0,0878	0,0887			
<b>0,0625%</b> <b>(2,04 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,5643	0,5617	0,5630	0,4710	30,85	
	S <sub>0</sub>	0,0912	0,0928	0,0928			
<b>0,03125%</b> <b>(1,02 ppm)</b>	S <sub>1</sub>	0,5796	0,5829	0,5813	0,4860	28,64	
	S <sub>0</sub>	0,0972	0,0933	0,0953			
<b>Blanko</b>		0,7218	0,7251	0,7235	0,6817		
<b>Kontrol blanko</b>		0,0415	0,0421	0,0418			
<b>Persamaan regresi</b>					$y = 26,733 + 0,8405 x$		

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 4.12** Penggabungan Fraksi Kolom Berdasarkan Pola Kromatogram KLT

<b>Fraksi</b>	<b>Eluen (mL)</b>	<b>Nilai Rf</b>	<b>Fraksi Gabungan</b>
Heksana-Etil asetat (190:10)	Heksana-Etil	-	-
Heksana-Etil asetat (180:20)	asetat (9:1)	0,79	A
Heksana-Etil asetat (170:30)		0,79	B
Heksana-Etil asetat (180:20)	Heksana-Etil asetat (8:2)	0,87	A
Heksana-Etil asetat (170:30)		0,87	B
Heksana-Etil asetat (160:40)		0,58	C
Heksana-Etil asetat (130:70)		0,58	
Heksana-Etil asetat (100:100)		0,58	
Heksana-Etil asetat (100:100)	Heksana-Etil asetat (8:2)	0,67	D
Heksana-Etil asetat (80:120)		0,65	
Heksana-Etil asetat (60:140)		0,63	
Heksana-Etil asetat (40:160)		0,63	E
Heksana-Etil asetat (0:200)		0,63	
Etil asetat-Metanol (190:10)	Etil asetat-	0,74	F
Etil asetat-Metanol (180:20)	Metanol (8:2)	0,67	G
Etil asetat-Metanol (170:30)		0,67	H
Etil asetat-Metanol (160:40)		0,48	I
Etil asetat-Metanol (150:50)	0,48		
Etil asetat-Metanol (150:50)	Etil asetat-	0,60	
Etil asetat-Metanol (140:60)	Metanol (3:2)	0,60	

**Tabel 4.12** (Lanjutan)

Etil asetat-Metanol (130:70)	Etil asetat-	0,60	I
Etil asetat-Metanol (120:80)	Metanol	0,60	
Etil asetat-Metanol (100:100)	(3:2)	0,10	
Etil asetat-Metanol (100:100)	Etil asetat-	0,73	J
Etil asetat-Metanol (80:120)	Metanol (2:3)	0,73	
Etil asetat-Metanol (60:140)		0,73	
Etil asetat-Metanol (0:200)		-	

**Tabel 4.13.** Rendemen Fraksi Kolom Gabungan terhadap Ekstrak Etil Asetat 5,4 g

<b>Nama Fraksi</b>	<b>Berat (mg)</b>	<b>Rendemen Fraksi (%)</b>
Fraksi Gabungan A	123,6	2,29
Fraksi Gabungan B	221,4	4,10
Fraksi Gabungan C	176,9	3,28
Fraksi Gabungan D	194,8	3,61
Fraksi Gabungan E	401,0	7,43
Fraksi Gabungan F	146,3	2,71
Fraksi Gabungan G	94,6	1,75
Fraksi Gabungan H	276,9	5,13
Fraksi Gabungan I	288,1	5,34
Fraksi Gabungan J	113,4	2,10



**Tabel 4.14.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan A

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>				
3,5	S <sub>1</sub>	0,3171	0,3208	0,3190	0,2990	56,63	2,38
	S <sub>0</sub>	0,0198	0,0202	0,0200			
1,75	S <sub>1</sub>	0,3757	0,3712	0,3735	0,3520	48,94	
	S <sub>0</sub>	0,0211	0,0219	0,0215			
0,875	S <sub>1</sub>	0,4380	0,4303	0,4342	0,4102	40,50	
	S <sub>0</sub>	0,0262	0,0217	0,0240			
0,4375	S <sub>1</sub>	0,4810	0,4856	0,4833	0,4512	34,55	
	S <sub>0</sub>	0,0312	0,0329	0,0321			
0,21875	S <sub>1</sub>	0,5135	0,5112	0,5124	0,4787	30,56	
	S <sub>0</sub>	0,0333	0,0341	0,0337			
0,1094	S <sub>1</sub>	0,5341	0,5316	0,5329		28,59	
	S <sub>0</sub>	0,0399	0,0413	0,0406			
<b>Blanko</b>		0,7350	0,7373	0,7362	0,6894		
<b>Kontrol blanko</b>		0,0437	0,0498	0,0468			
<b>Persamaan regresi</b>					y = 30,5657 + 8,1815 x		

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 4.15.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan B

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>				
4,2	S <sub>1</sub>	0,3149	0,3105	0,3127	0,2937	57,40	2,21
	S <sub>0</sub>	0,0188	0,0192	0,0190			
2,1	S <sub>1</sub>	0,3599	0,3610	0,3605	0,3365	51,19	
	S <sub>0</sub>	0,0232	0,0247	0,0240			
1,05	S <sub>1</sub>	0,3707	0,3739	0,3723	0,3463	49,77	
	S <sub>0</sub>	0,0256	0,0263	0,0260			
0,525	S <sub>1</sub>	0,4325	0,4298	0,4312	0,3964	42,50	
	S <sub>0</sub>	0,0324	0,0371	0,0348			
0,2625	S <sub>1</sub>	0,4619	0,4666	0,4643	0,4257	38,25	
	S <sub>0</sub>	0,0394	0,0378	0,0386			
0,13125	S <sub>1</sub>	0,4771	0,4655	0,4713	0,4323	37,29	
	S <sub>0</sub>	0,0400	0,0379	0,0390			
Blanko		0,7350	0,7373	0,7362	0,6894		
Kontrol blanko		0,0437	0,0498	0,0468			
<b>Persamaan regresi</b>					$y = 39,5653 + 4,7175 x$		

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 4.16.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan C

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>				
4,87	S <sub>1</sub>	0,3508	0,3524	0,3516	0,3279	52,44	3,95
	S <sub>0</sub>	0,0254	0,0219	0,0237			
2,435	S <sub>1</sub>	0,4099	0,4117	0,4108	0,3802	44,85	
	S <sub>0</sub>	0,0313	0,0298	0,0306			
1,2175	S <sub>1</sub>	0,4418	0,4391	0,4405	0,4031	41,53	
	S <sub>0</sub>	0,0366	0,0382	0,0374			
0,60875	S <sub>1</sub>	0,4661	0,4690	0,4676	0,4273	38,02	
	S <sub>0</sub>	0,0412	0,0394	0,0403			
0,3044	S <sub>1</sub>	0,5107	0,5125	0,5116	0,4591	33,41	
	S <sub>0</sub>	0,0532	0,0517	0,0525			
0,1522	S <sub>1</sub>	0,5341	0,5316	0,5329	0,4768	30,84	
	S <sub>0</sub>	0,0567	0,0555	0,0561			
Blanko		0,7350	0,7373	0,7362	0,6894		
Kontrol blanko		0,0437	0,0498	0,0468			
<b>Persamaan regresi</b>					$y = 33,5217 + 4,17 x$		

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 4.17.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan D

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>				
8,734	S <sub>1</sub>	0,3619	0,3667	0,3643	0,3399	50,70	8,61
	S <sub>0</sub>	0,0210	0,0277	0,0244			
4,367	S <sub>1</sub>	0,4668	0,4653	0,4661	0,4244	38,44	
	S <sub>0</sub>	0,0411	0,0423	0,0417			
2,1835	S <sub>1</sub>	0,4772	0,4690	0,4731	0,4262	38,17	
	S <sub>0</sub>	0,0473	0,0465	0,0469			
1,09175	S <sub>1</sub>	0,5107	0,5137	0,5122	0,4644	32,64	
	S <sub>0</sub>	0,0477	0,0479	0,0478			
0,5459	S <sub>1</sub>	0,5150	0,5192	0,5171	0,4687	32,01	
	S <sub>0</sub>	0,0481	0,0487	0,0484			
0,2729	S <sub>1</sub>	0,5306	0,5259	0,5283	0,4793	30,48	
	S <sub>0</sub>	0,0490	0,0489	0,0490			
Blanko		0,7350	0,7373	0,7362	0,6894		
Kontrol blanko		0,0437	0,0498	0,0468			
<b>Persamaan regresi</b>					$y = 30,62 + 2,251x$		

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 4.18.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan E

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>				
9,6	S <sub>1</sub>	0,3473	0,3512	0,3493	0,3155	54,24	6,75
	S <sub>0</sub>	0,0324	0,0351	0,0338			
4,8	S <sub>1</sub>	0,3779	0,3805	0,3792	0,3430	50,25	
	S <sub>0</sub>	0,0346	0,0378	0,0362			
2,4	S <sub>1</sub>	0,4496	0,4460	0,4477	0,4078	40,85	
	S <sub>0</sub>	0,0397	0,0400	0,0399			
1,2	S <sub>1</sub>	0,4778	0,4816	0,4797	0,4378	36,50	
	S <sub>0</sub>	0,0416	0,0421	0,0419			
0,6	S <sub>1</sub>	0,5013	0,4987	0,5000	0,4590	33,42	
	S <sub>0</sub>	0,0409	0,0411	0,0410			
0,3	S <sub>1</sub>	0,5127	0,5109	0,5118	0,4670	32,26	
	S <sub>0</sub>	0,0431	0,0465	0,0448			
Blanko		0,7350	0,7373	0,7362	0,6894		
Kontrol blanko		0,0437	0,0498	0,0468			
<b>Persamaan regresi</b>					y = 33,6 + 2,428 x		

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 4.19.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan F

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>				
3,53	S <sub>1</sub>	0,3190	0,3105	0,3148	0,2933	57,46	2,17
	S <sub>0</sub>	0,0237	0,0193	0,0215			
1,767	S <sub>1</sub>	0,3770	0,3712	0,3741	0,3469	49,68	
	S <sub>0</sub>	0,0246	0,0297	0,0272			
0,883	S <sub>1</sub>	0,4180	0,4198	0,4189	0,3868	43,90	
	S <sub>0</sub>	0,0324	0,0317	0,0321			
0,4417	S <sub>1</sub>	0,4441	0,4467	0,4454	0,4121	40,23	
	S <sub>0</sub>	0,0326	0,0339	0,0333			
0,2208	S <sub>1</sub>	0,4963	0,5044	0,5004	0,4522	34,41	
	S <sub>0</sub>	0,0478	0,0486	0,0482			
0,1104	S <sub>1</sub>	0,5160	0,5187	0,5174	0,4681	32,1	
	S <sub>0</sub>	0,0488	0,0497	0,0493			
Blanko		0,7350	0,7373	0,7362	0,6894		
Kontrol blanko		0,0437	0,0498	0,0468			
<b>Persamaan regresi</b>					y = 34,95 + 6,937 x		

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 4.20.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan G

Konsentrasi (ppm)		Serapan (A)		Serapan rata- rata	S1-S0	% Inhibisi	IC50 (ppm)
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>				
8,46	S <sub>1</sub>	0,2614	0,2625	0,2620	0,2446	64,52	1,16
	S <sub>0</sub>	0,0178	0,0169	0,0174			
4,23	S <sub>1</sub>	0,3192	0,3204	0,3198	0,2978	56,80	
	S <sub>0</sub>	0,0216	0,0223	0,0220			
2,17	S <sub>1</sub>	0,3552	0,3510	0,3531	0,3258	52,74	
	S <sub>0</sub>	0,0267	0,0279	0,0273			
1,06	S <sub>1</sub>	0,3597	0,3655	0,3626	0,3353	51,37	
	S <sub>0</sub>	0,0267	0,0279	0,0273			
0,53	S <sub>1</sub>	0,3800	0,3793	0,3797	0,3489	49,39	
	S <sub>0</sub>	0,0301	0,0314	0,0308			
0,26	S <sub>1</sub>	0,4149	0,4110	0,4130	0,3769	45,33	
	S <sub>0</sub>	0,0367	0,0354	0,0361			
Blanko		0,7350	0,7373	0,7362	0,6894		
Kontrol blanko		0,0437	0,0498	0,0468			
<b>Persamaan regresi</b>					$y = 47,61 + 2,063 x$		

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 4.21.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan H

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>				
15,32	S <sub>1</sub>	0,3232	0,3290	0,3261	0,3004	56,43	11,63
	S <sub>0</sub>	0,0277	0,0236	0,0257			
7,66	S <sub>1</sub>	0,4204	0,4193	0,4199	0,3872	43,84	
	S <sub>0</sub>	0,0310	0,0343	0,0327			
3,83	S <sub>1</sub>	0,4856	0,4888	0,4872	0,4514	34,52	
	S <sub>0</sub>	0,0354	0,0362	0,0358			
1,92	S <sub>1</sub>	0,5105	0,5125	0,5115	0,4726	31,45	
	S <sub>0</sub>	0,0387	0,0390	0,0389			
0,958	S <sub>1</sub>	0,5319	0,5321	0,5320	0,4897	28,97	
	S <sub>0</sub>	0,0431	0,0414	0,0423			
0,479	S <sub>1</sub>	0,5553	0,5598	0,5576	0,5100	26,02	
	S <sub>0</sub>	0,0488	0,0463	0,0476			
Blanko		0,7350	0,7373	0,7362	0,6894		
Kontrol blanko		0,0437	0,0498	0,0468			
<b>Persamaan regresi</b>					$y = 26,86 + 1,99x$		

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 4.22.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan I

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>				
16,8	S <sub>1</sub>	0,3181	0,3049	0,3115	0,2793	59,49	16,28
	S <sub>0</sub>	0,0317	0,0326	0,0322			
8,4	S <sub>1</sub>	0,5153	0,5187	0,5170	0,4835	29,87	
	S <sub>0</sub>	0,0322	0,0347	0,0335			
4,2	S <sub>1</sub>	0,5957	0,5938	0,5955	0,5565	19,28	
	S <sub>0</sub>	0,0393	0,0387	0,0390			
2,1	S <sub>1</sub>	0,6180	0,5952	0,6030	0,5610	18,62	
	S <sub>0</sub>	0,0412	0,0427	0,0420			
1,05	S <sub>1</sub>	0,6410	0,6436	0,6423	0,5956	13,60	
	S <sub>0</sub>	0,0471	0,0462	0,0467			
0,525	S <sub>1</sub>	0,6587	0,6614	0,6601	0,6111	11,36	
	S <sub>0</sub>	0,0493	0,0486	0,0490			
Blanko		0,7350	0,7373	0,7362	0,6894		
Kontrol blanko		0,0437	0,0498	0,0468			
<b>Persamaan regresi</b>					$y = 9,689 + 2,844x$		

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 4.23.** Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase pada Fraksi Gabungan J

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>				
59,36	S <sub>1</sub>	0,3124	0,3199	0,3162	0,2889	58,09	49,81
	S <sub>0</sub>	0,0247	0,0298	0,0273			
29,68	S <sub>1</sub>	0,5161	0,5105	0,5133	0,4749	31,12	
	S <sub>0</sub>	0,0388	0,0379	0,0384			
14,84	S <sub>1</sub>	0,5697	0,5673	0,5685	0,5277	23,45	
	S <sub>0</sub>	0,0396	0,0419	0,0408			
7,42	S <sub>1</sub>	0,5842	0,5938	0,5890	0,5443	21,04	
	S <sub>0</sub>	0,0450	0,0443	0,0447			
3,71	S <sub>1</sub>	0,6787	0,6749	0,6768	0,6291	8,75	
	S <sub>0</sub>	0,0473	0,0480	0,0477			
1,8567	S <sub>1</sub>	0,6833	0,6782	0,6808	0,6316	8,38	
	S <sub>0</sub>	0,0487	0,0476	0,0482			
Blanko		0,7350	0,7373	0,7362	0,6894		
Kontrol blanko		0,0437	0,0498	0,0468			
<b>Persamaan regresi</b>					$y = 9,157 + 0,82 x$		

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 4.24.** Hasil Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Enzim Fraksi Teraktif/ Etil Asetat

Konsentrasi Substrat [S] (mM)	Serapan (V)		1/[Substrat]	1/ V <sub>0</sub>	1/ V <sub>1</sub>
	V <sub>0</sub>	V <sub>1</sub>			
15	0,5925	0,6055	0,067	1,6878	1,6515
10	0,6092	0,5797	0,1	1,6415	1,7250
5	0,6453	0,4089	0,2	1,5497	2,4456
2,5	0,4750	0,2372	0,4	2,1053	4,2159
1,25	0,2860	0,1770	0,8	3,4965	5,6497

Keterangan : V<sub>0</sub> = Tanpa inhibitor; V<sub>1</sub> = inhibitor 8,375 ppm

**Tabel 4.25.** Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten Fraksi Etil Asetat 8,375ppm

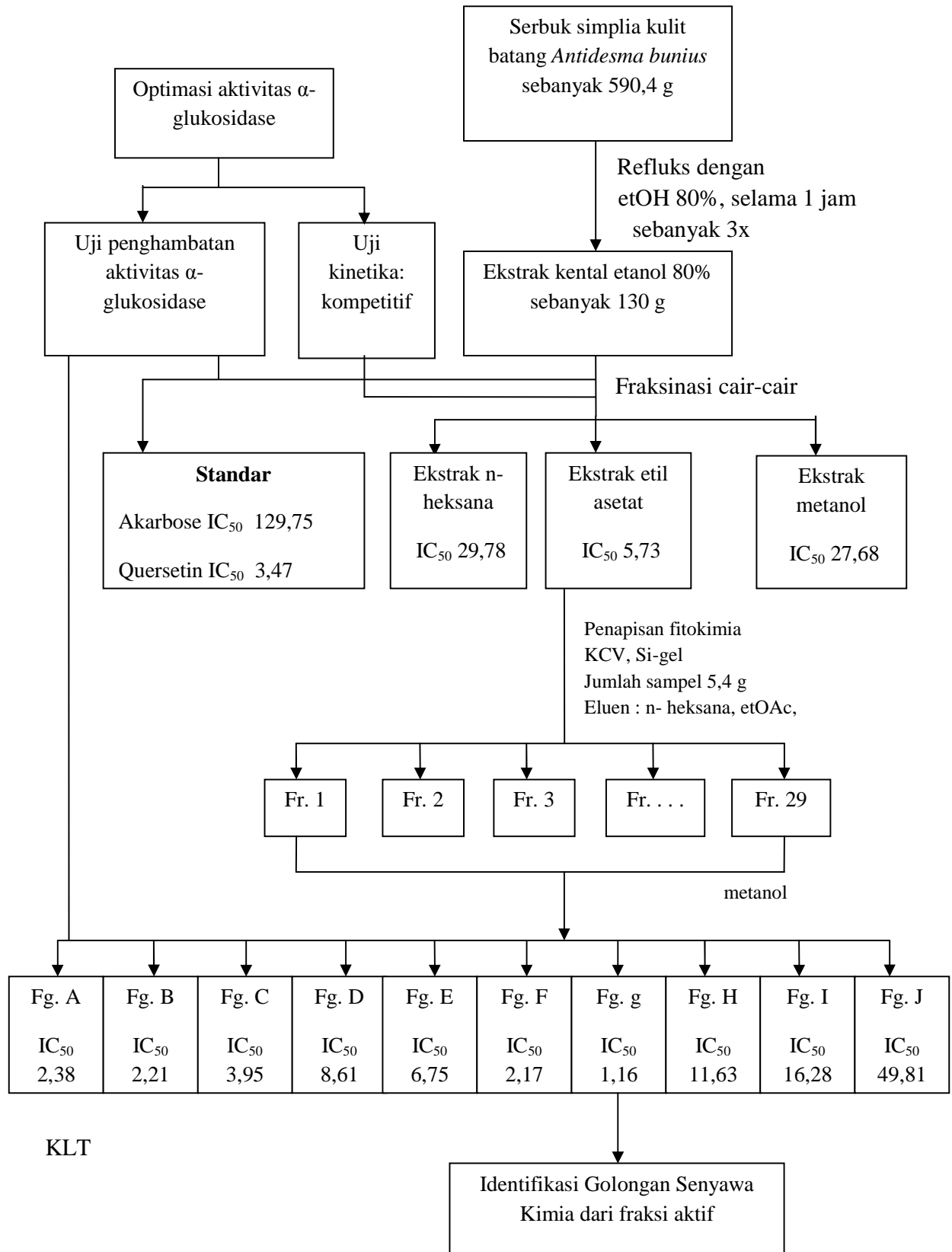
	a	B	V <sub>max</sub> (1/a)	K <sub>m</sub> (b/a)
Tanpa inhibitor	1,2839	2,592	0,78	2,02
Inhibitor 8,375 ppm	1,3593	5,6740	0,74	4,17

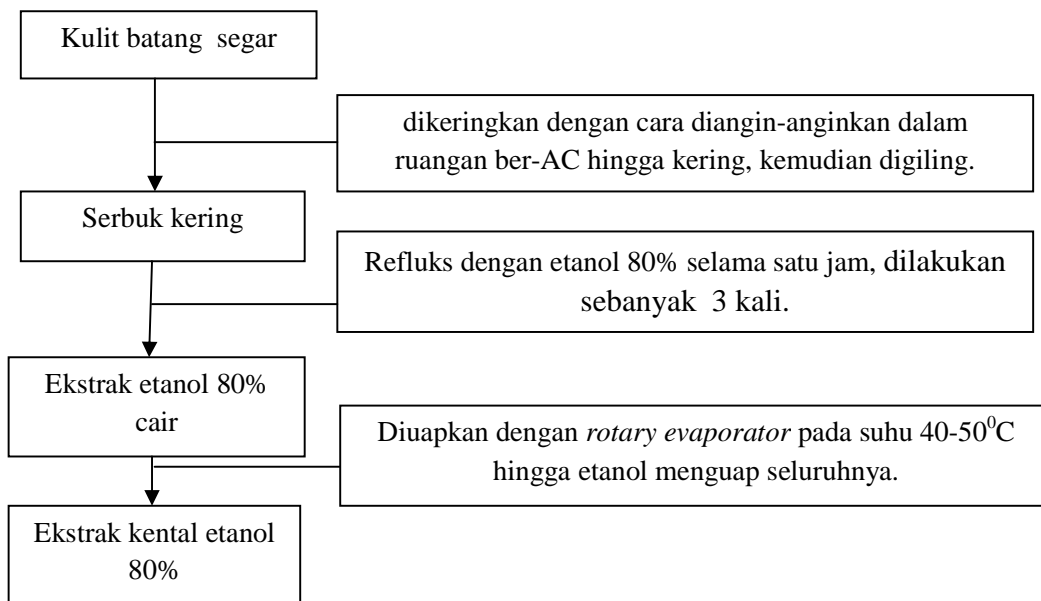
**Tabel 4.26.** Hasil Identifikasi Golongan Senyawa pada Ekstrak Etanol 80%, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi G Kulit Batang *Antidesma bunius* (L.) Spreng

Golongan senyawa	Pereaksi	Standar/ Pembanding	Kulit batang <i>Antidesma bunius</i>		
			Ekstrak etanol 80%	Fraksi etil asetat	Fraksi G
Sterol- Terpen	pereaksi semprot vanilin- asam sulfat	bercak ungu (Caryophylli Flos)	bercak ungu (+)	bercak ungu (+)	Tidak ada bercak (-)
Alkaloid	pereaksi semprot Dragendorff	bercak jingga (Chinae Korteks)	tidak ada bercak (-)	tidak ada bercak (-)	tidak ada bercak (-)
Flavonoid	pereaksi semprot AlCl <sub>3</sub>	fluoresensi kuning (Ortosiphonis Folium)	fluoresensi kuning (+)	fluoresensi kuning (+)	fluoresensi kuning (+)
Gula	Molisch	cincin ungu (Nerii Folium)	cincin ungu (+)	cincin ungu (+)	cincin ungu (+)
Tanin	gelatin	endapan putih (Theae Folium)	endapan putih (+)	tidak ada endapan putih (-)	tidak ada endapan putih (-)
Saponin	air panas + HCl 2 N	Berbusa ( <i>Ortosiphonis Folium</i> )	Berbusa hingga 1,4 cm (+)	Tidak berbusa (-)	Tidak berbusa (-)
Antraquinon	Pereaksi KOH	Bercak merah (Rhei Radix)	tidak ada bercak (-)	tidak ada bercak (-)	tidak ada bercak (-)

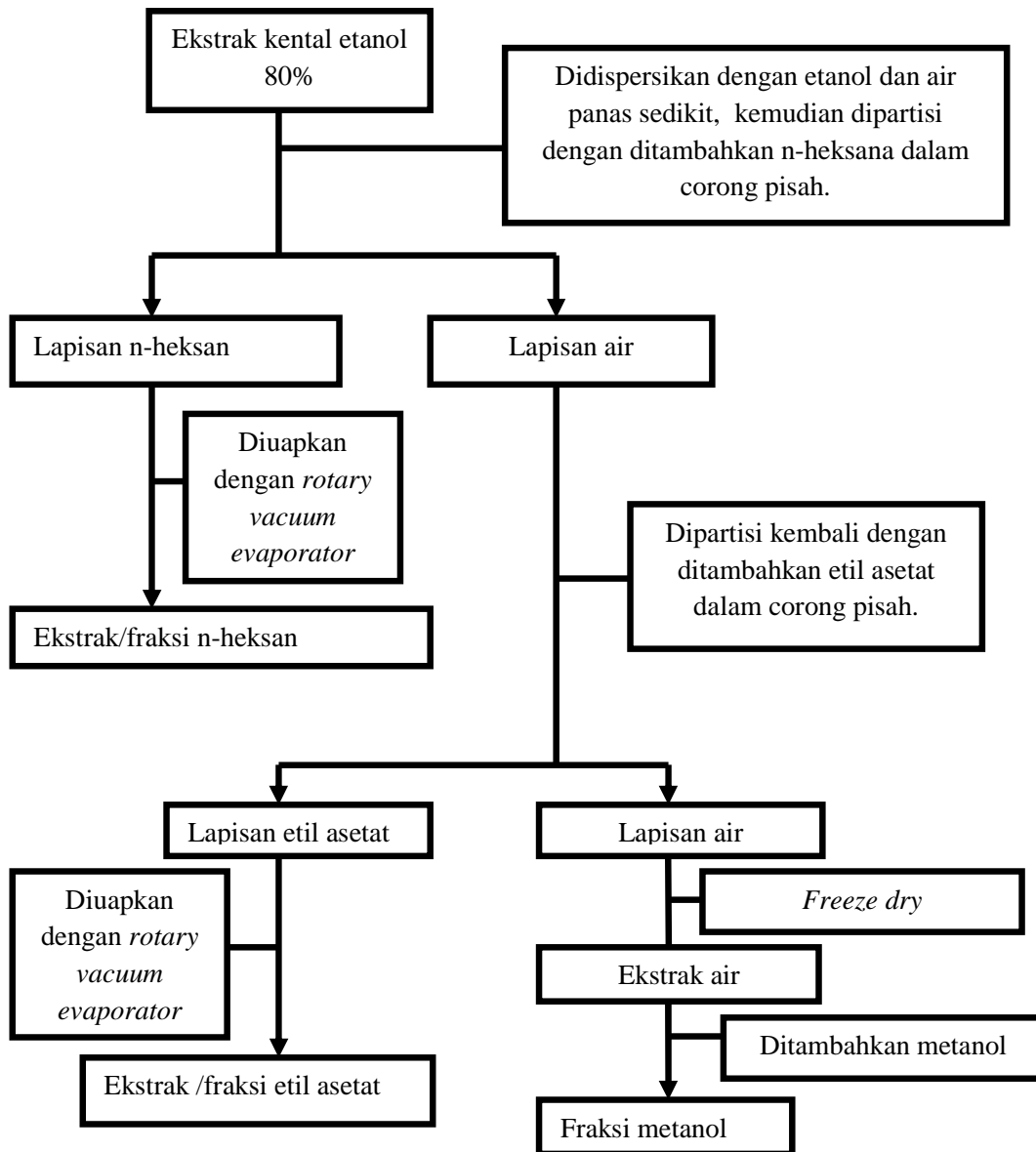
# LAMPIRAN

**Lampiran 1. Skema Prosedur Pelaksanaan**

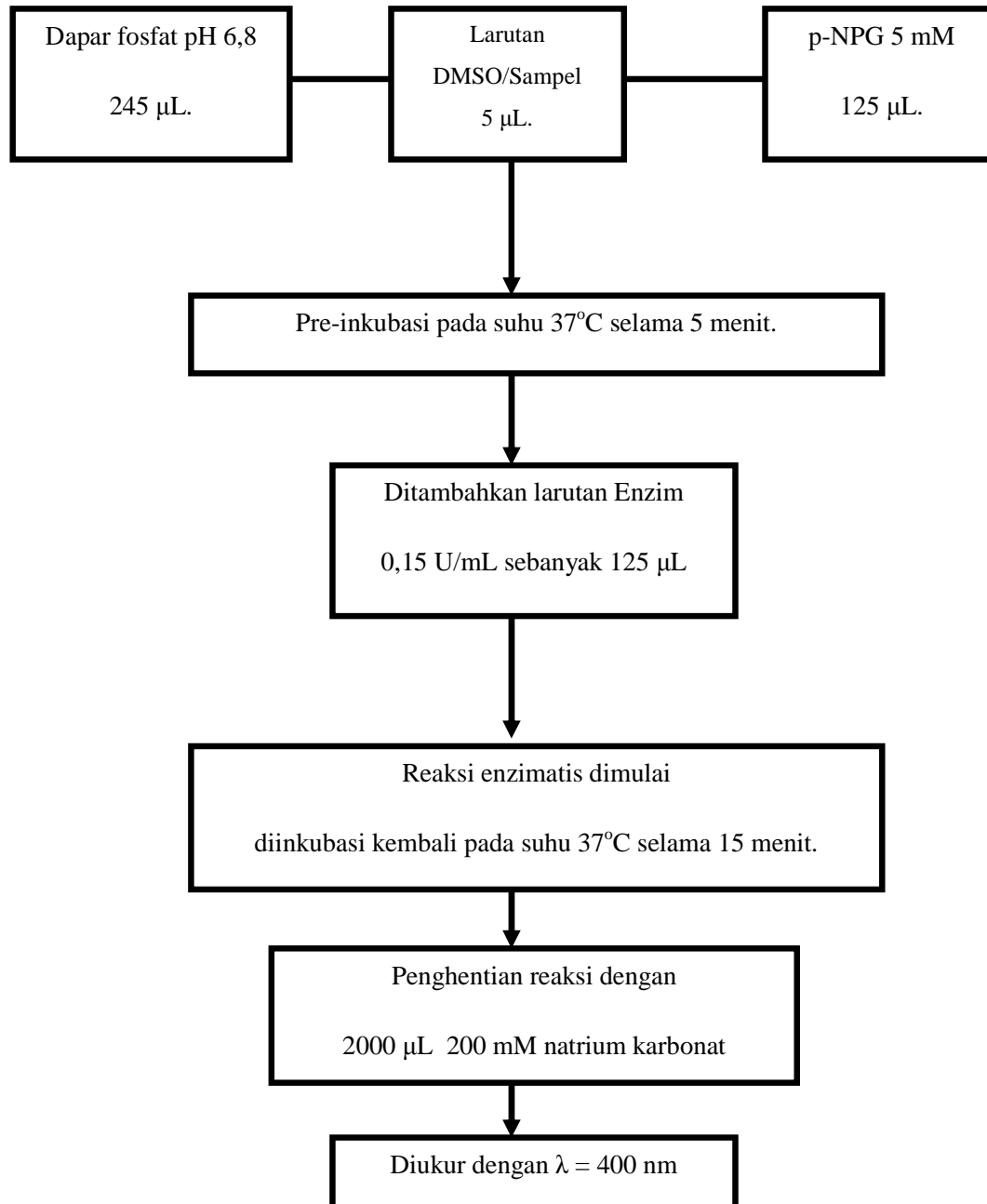


**Lampiran 2.** Skema Persiapan Sampel dan Ekstraksi

### Lampiran 3. Skema Fraksinasi





**Lampiran 4.** Skema Uji Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -glukosidase

### Lampiran 5. Perhitungan unit larutan enzim

Label yang terdapat pada kemasan  $\alpha$ -glukosidase adalah 750 Unit; 16,1 mg; 25 % protein; 179 Unit/mg protein.

$$\text{Jumlah protein} = \frac{25}{100} \times 16,1 \text{ mg serbuk} = 4,025 \text{ mg protein.}$$

Perbandingan jumlah protein dengan total massa serbuk

$$\frac{4,025 \text{ mg protein}}{16,1 \text{ mg solid}} = \frac{1 \text{ mg protein}}{4 \text{ mg solid}} \rightarrow 1 \text{ mg protein} \sim 4 \text{ mg serbuk} \sim 179 \text{ unit}$$

$$\frac{16,1 \text{ mg solid}}{4 \text{ mg solid}} \times 179 \text{ Unit} = 720,475 \text{ Unit}$$

Jadi, dalam 1 kemasan  $\alpha$ -glukosidase mengandung 720,475 Unit.

Berdasarkan jurnal acuan, digunakan enzim alfa glukosidase  $0,15 \frac{U}{mL}$ . (Elya, Basah, Mun'im, Yuliasuti, Bangun, & Kurnia, 2012)

Penimbangan enzim  $\alpha$ -glukosidase untuk pengujian

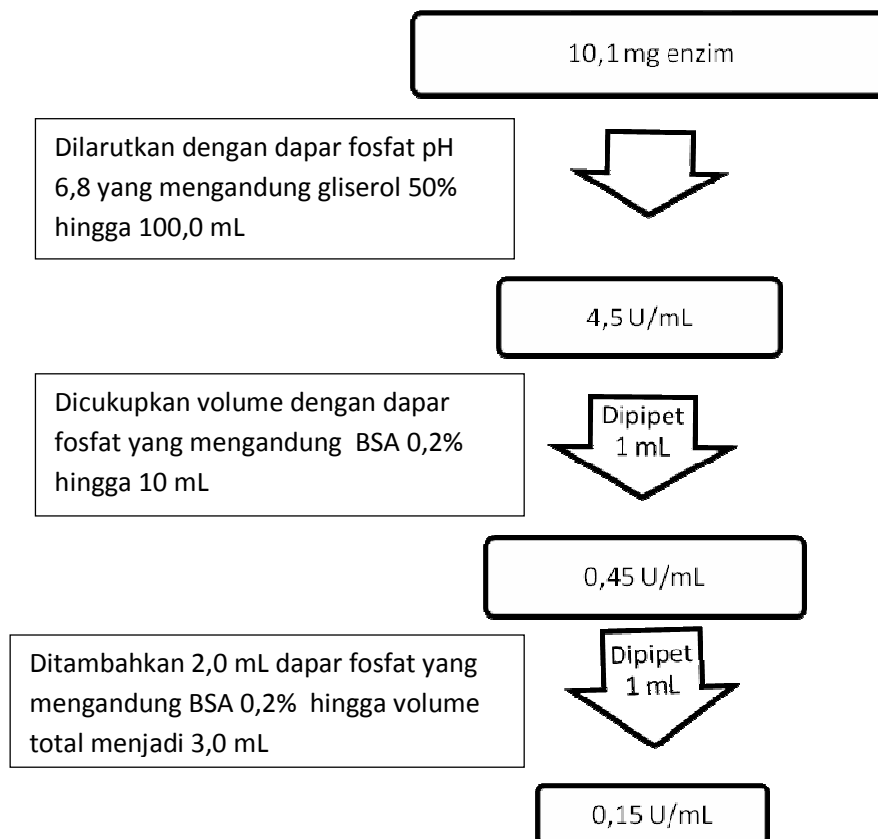
$$0,15 \frac{U}{mL} \times 100 \text{ mL} = 15 \text{ U}$$

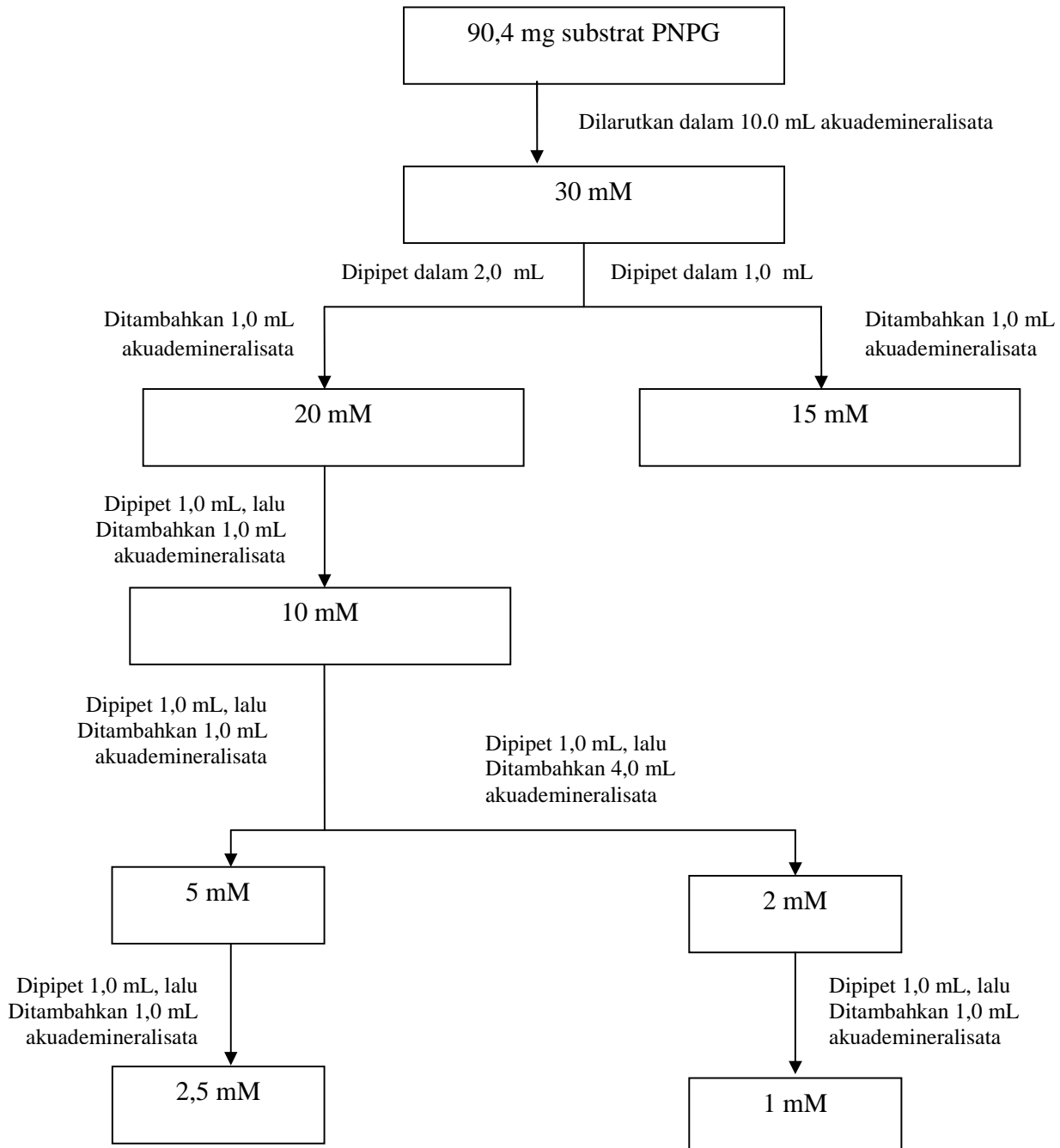
$$\frac{15 \text{ U}}{179 \text{ U/mg protein}} = 0,0838 \text{ mg protein}$$

$$\frac{0,0838 \text{ mg protein}}{4,025 \text{ mg protein}} \times 16,1 \text{ mg solid} = 0,3352 \text{ mg solid}$$


Berdasarkan perhitungan di atas, larutan  $0,15 \text{ Unit/mL}$  dapat dibuat dengan cara melarutkan  $0,3352 \text{ mg}$   $\alpha$ -glukosidase dengan larutan dapar fosfat berbagai pH 6,6; 6,8; dan 7,0 yang telah mengandung BSA 0,2% secukupnya hingga  $100,0 \text{ mL}$ .

Untuk melakukan penimbangan enzim sebesar  $0,3352 \text{ mg}$  sangat sulit dan tidak kuantitatif sehingga larutan enzim dibuat dengan menimbang  $10,1 \text{ mg}$  kemudian dilarutkan dalam dapar fosfat pH 6,8 dan dilakukan pengenceran sebanyak dua kali hingga didapatkan larutan enzim  $0,15 \text{ Unit/mL}$ .

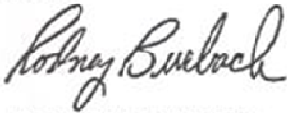
**Lampiran 6.** Skema prosedur pembuatan unit larutan enzim

**Lampiran 7.** Skema prosedur pembuatan larutan substrat PNPG


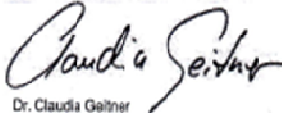
**Lampiran 8.** Surat determinasi tanaman *Antidesma bunius*

 <p><b>LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA</b>  <b>( Indonesian Institute of Sciences )</b>  <b>PUSAT KONSERVASI TUMBUHAN - KEBUN RAYA BOGOR</b>  <b>( Center for Plant Conservation - Bogor Botanical Gardens )</b>          Jalan Ir. H. Juanda No. 13, P.O. BOX 309 Bogor 16003, Indonesia          Telepon (0251) 8322187 - 8321657 - 8322220 - 8311362, 8352519, Fax. 62 (251) 8322187, 8313885          e-mail : kriblipi@indosat.net.id</p>	
Bogor, 4 <del>4</del> Maret 2012	
No.	: 8 <del>4</del> /IPH.3.02/KS/III/2012
Lampiran	: -
Hal	: Keterangan determinasi
	Kepada Yth.: Sdri. Purwa Indah Septi Maharani NPM. 0806398581 Fakultas Farmasi Universitas Indonesia Depok
<p>Dengan hormat,</p> <p>Dengan ini kami sampaikan bahwa spesimen tumbuhan yang diambil dari Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor, LIPI adalah dari jenis kulit batang <i>Antidesma bunius</i> (L.) Spreng., yang merupakan anggota Suku Euphorbiaceae.</p> <p>Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.</p>	
<p>a.n. KEPALA          Kepala Bidang Konservasi Ex-situ</p>  <p>Dr. Joko Ridho Witono          NIP. 197010091994031004</p> 	

Lampiran 9. Sertifikat analisis  $\alpha$ -glukosidase

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

**Lampiran 10. Sertifikat analisis substrat 4-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida**

SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup>		 <small>Industriestrasse 25, CH-9411 Buchs (SG), Switzerland Tel: +41 81 755 2511 Fax: +41 81 755 5449</small>	
<b>Certificate of Analysis</b>			
<b>Product Name:</b>	4-NITROPHENYL $\alpha$ -D-GLUCOPYRANOSIDE		
	≥ 99 %		
<b>Product Number:</b>	N1377		
<b>Product Brand:</b>	Sigma		
<b>Molecular Formula:</b>	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub>		
<b>Molecular Mass:</b>	301.25		
<b>CAS Number:</b>	3767-28-0		
<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>	<b>LOT BCBG2931V RESULTS</b>	
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF-WHITE	WHITE	
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER	
PURITY (TLC AREA %)	≥ 99 %	99.0 %	
SPECIFIC ROTATION (20/D)	210 - 220 DEGREES	210.1 DEGREES	
CONCENTRATION	C=1 IN WATER	C=1 IN WATER	
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS TO YELLOW-GREEN	VERY FAINT YELLOW-GREEN	
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR TO VERY SLIGHTLY HAZY	CLEAR	
SOLUBILITY (METHOD)	20 MG/ML IN METHANOL	20 MG/ML IN METHANOL	
<b>QC RELEASE DATE</b>	09/AUG/11		
<b>RECOMMENDED RETEST DATE</b>	JUL/16		
 Dr. Claudia Galtner Manager Quality Control Buchs, Switzerland			