



**POTENSI EKSTRAK FENOLIK TANAMAN OBAT TAMAN NASIONAL  
MERU BETIRI: BIDARA UPAS (*Merreimia mammosa*) DAN KAYU  
KUNING (*Arcangelisia flava*) SEBAGAI ANTIDIABETIK  
DAN ANTIOKSIDAN**

**SKRIPSI**

Oleh

**Lilik Duwi Wahyudi**

**NIM 111810301014**

**JURUSAN KIMIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2015**



**POTENSI EKSTRAK FENOLIK TANAMAN OBAT TAMAN NASIONAL  
MERU BETIRI: BIDARA UPAS (*Merreimia mammosa*) DAN KAYU  
KUNING (*Arcangelisia flava*) SEBAGAI ANTIDIABETIK  
DAN ANTIOKSIDAN**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**Lilik Duwi Wahyudi**

**NIM 111810301014**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2015**

## **PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Lastik dan Ayahanda Martono tercinta;
2. Guru-guru sejak sekolah dasar sampai dengan perguruan tinggi;
3. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

## MOTO

Ilmu Pengetahuan itu pahit pada awalnya, tetapi manis melebihi madu pada akhirnya.\*)

“Semakin banyak saya membaca, semakin banyak saya mendapatkan ilmu, semakin yakin bahwa saya tidak mengetahui apa-apa.\*\*)

Dan mereka yang berjuang dan bersungguh-sungguh datang kepada Kami, Kami pasti akan menunjuki mereka jalan-jalan Kami.  
(terjemahan Surat *Al-Ankabuut* ayat 69).\*

---

\*) Rais, H. S. dan Almahendra, R. 2013. *99 Cahaya di Langit Eropa: Perjalanan Menapak Jejak Islam di Eropa*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.

\*\*) Juliot, A. 1982. “*Candide, un roman philosophique*” in *analyses et reflexions sur “candied” de Voltaire*. Paris: Edition Matketing.

\*\*\*) Al-Qarni, A. A. 2006. *Don't Be Sad: Cara Hidup Positif Tanpa Pernah Sedih dan Frustrasi*. Jakarta: Maghfirah Pustaka.

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Lilik Duwi Wahyudi

NIM : 111810301014

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Potensi Ekstrak Fenolik Tanaman Obat Taman Nasional Meru Betiri: Bidara Upas (*Merreimia mammosa*) dan Kayu Kuning (*Arcangelisia flava*) sebagai Antidiabetik dan Antioksidan“ adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 30 Juni 2015

Yang menyatakan,

Lilik Duwi Wahyudi

NIM 111810303014

## **SKRIPSI**

# **POTENSI EKSTRAK FENOLIK TANAMAN OBAT TAMAN NASIONAL MERU BETIRI: BIDARA UPAS (*Merreimia mammosa*) DAN KAYU KUNING (*Arcangelisia flava*) SEBAGAI ANTIDIABETIK DAN ANTIOKSIDAN**

Oleh

Lilik Duwi Wahyudi

NIM 111810301014

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Potensi Ekstrak Fenolik Tanaman Obat Taman Nasional Meru Betiri: Bidara Upas (*Merreimia mammosa*) dan Kayu Kuning (*Arcangelisia flava*) sebagai Antidiabetik dan Antioksidan” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Tim Penguji;

Ketua (DPU),

Sekretaris (DPA),

Dr. A. A. I. Ratnadewi, S.Si., M.Si

NIP. 19701225199702200

Penguji I,

Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D

NIP. 197008101998031001

Penguji II,

Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si

NIP. 197104301998031003

Ika Oktavianawati S.Si, M.Sc

NIP. 198010012003122001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Jember

Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D

NIP. 196101081986021001

## RINGKASAN

**Potensi Ekstrak Fenolik Tanaman Obat Taman Nasional Meru Betiri: Bidara Upas (*Merreimia mammosa*) dan Kayu Kuning (*Arcangelisia flava*) sebagai Antidiabetik dan Antioksidan;** Lilik Duwi Wahyudi, 111810301014; 2015: 113 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit metabolisme yang secara global prevalensinya tinggi. Akumulasi glukosa darah yang berlebih pada penderita DM menyebabkan berbagai komplikasi karena glukosa dapat mengalami reaksi autooksidasi yang menghasilkan radikal bebas. Radikal anion superoksida dan hidroksil yang dihasilkan dapat bereaksi dengan berbagai makromolekul tubuh sehingga menyebabkan stres oksidatif. Terapi farmakologis menggunakan obat antidiabetik sintetis seperti akarbose memiliki efek samping pada gastrointestinal sedangkan obat antioksidan sintetis seperti butil hidroksianisol bersifat karsinogenesis. Kondisi ini menyebabkan banyak penelitian diarahkan untuk mencari obat antidiabetik dan antioksidan alami yang berasal dari bahan alam. Bidara upas dan Kayu kuning merupakan bahan baku obat tradisional yang tumbuh di kawasan Taman Nasional Meru Betiri. Potensi ekstrak fenolik dari Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antidiabetik dan antioksidan dianalisis dalam penelitian ini.

Potensi ekstrak fenolik Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antidiabetik dan antioksidan dianalisis secara *in-vitro* menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Radikal DPPH digunakan untuk melihat potensi ekstrak sebagai antioksidan secara umum sedangkan potensinya sebagai antioksidan yang lebih spesifik menggunakan radikal anion superoksida dan hidroksil. Hasil analisis peredaman radikal DPPH dalam bentuk  $IC_{50}$  dibandingkan untuk menentukan ekstrak yang paling berpotensi sebagai peredam radikal tersebut. Nilai  $IC_{50}$  yang lebih kecil menunjukkan potensinya yang lebih baik. Potensi ekstrak sebagai peredam radikal anion superoksida dan



hidroksil dilihat dari nilai persen peredamannya. Ekstrak dengan konsentrasi yang sama dan memiliki persen peredaman yang lebih tinggi menunjukkan potensi yang lebih baik. Vitamin C digunakan sebagai standar dalam analisis antioksidan sedangkan akarbosa digunakan sebagai standar dalam analisis antidiabetik. Analisis potensi ekstrak sebagai antidiabetik didasarkan pada penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase. Ekstrak yang memiliki persen penghambatan pada  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase yang lebih tinggi pada konsentrasi yang sama dikatakan lebih berpotensi. Mekanisme penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase oleh senyawa aktif dalam ekstrak yang paling berpotensi sebagai antidiabetik dipelajari dari kinetika penghambatannya.

Hasil analisis antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning berpotensi sebagai antioksidan dibandingkan dengan standar vitamin C. Ekstrak MBU (metanol Bidara upas) meredam aktivitas radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil tertinggi dibandingkan ekstrak HBU (heksana Bidara upas) dan EBU (etil asetat Bidara upas). Ekstrak MKK (metanol Kayu kuning) meredam aktivitas radikal DPPH dan hidroksil tertinggi dibandingkan ekstrak HKK (heksana Kayu kuning) dan EKK (etil asetat Kayu kuning). Ekstrak EKK meredam aktivitas radikal anion superoksida tertinggi dibandingkan ekstrak HKK dan MKK. Ekstrak HBU, EBU, HKK, dan EKK berpotensi sebagai antidiabetik dibandingkan dengan standar akarbosa sedangkan ekstrak MBU dan MKK tidak berpotensi. Ekstrak EKK paling berpotensi sebagai antidiabetik dibandingkan ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, dan MKK karena memiliki aktivitas penghambatan yang tinggi pada  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase. Senyawa aktif dalam ekstrak EKK menghambat  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase secara campuran yaitu kompetitif dan unkompetitif.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi Ekstrak Fenolik Tanaman Obat Taman Nasional Meru Betiri: Bidara Upas (*Merreimia mammosa*) dan Kayu Kuning (*Arcangelisia flava*) sebagai Antidiabetik dan Antioksidan”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si, selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Dr. A. A. I. Ratnadewi, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
4. Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si., selaku Dosen Penguji I dan Ika Oktavianawati S.Si, M.Sc., selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktunya guna menguji, serta memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
5. Tri Mulyono, S.Si, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
6. Bapak/Ibu dosen-dosen FMIPA terutama dosen-dosen Jurusan Kimia Universitas Jember yang telah memberikan ilmu pengetahuan;
7. teman-teman angkatan 2011 (solvent), terima kasih atas semangat, bantuan, saran, perhatian, dan kenangan yang telah diberikan;

8. Putu Irwan Yasa., Rosita Wahyuningrum., Jainur Rochman., Lutfi Septi Aksanantika., Diah Ayu Nor Sholeha., Susilowati., Robita Kartikasari., Romadhani Ibnu fadil, Muhammad naim., dan Okky Santi terima kasih atas doa, dorongan, semangat dan perhatian yang diberikan selama ini;
9. teman-teman seperjuangan di CDAST, terima kasih atas saran, kerjasama dan bantuannya;
10. teman-teman BS yang tak bisa disebut satu per satu terima kasih atas semangat, perhatian dan kenangan yang tak kan terlupakan;
11. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Juni 2015

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN MOTO .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBING .....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>vii</b>
<b>PRAKATA .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xx</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Batasan Masalah .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Tujuan Penelitian.....</b>	<b>4</b>
<b>1.5 Manfaat Penelitian.....</b>	<b>5</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Deskripsi Kayu Kuning dan Bidara Upas.....</b>	<b>6</b>
2.1.1 Kayu kuning ( <i>Arcangelisia flava</i> ).....	6
2.1.2 Bidara Upas ( <i>Merremia mammosa</i> ).....	8
<b>2.2 Senyawa Fenolik.....</b>	<b>10</b>
2.2.1 Fenilpropanoid.....	10
2.2.2 Lignan dan neolignan.....	12
2.2.3 Kumarin.....	14
2.2.4 Flavonoid.....	14
2.2.5 Tanin.....	16
<b>2.3 Ekstraksi Bioaktif.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Diabetes Melitus.....</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Kinetika Penghambatan Enzim.....</b>	<b>22</b>
<b>2.6 Radikal bebas dan Antioksidan.....</b>	<b>25</b>
<b>2.7 Spektrofotometri UV-Vis.....</b>	<b>27</b>
<b>2.8 Prinsip Analisis Antidiabetik dan Antioksidan.....</b>	<b>28</b>

2.8.1 Analisis Total Fenolik.....	28
2.8.2 Analisis Total flavonoid.....	29
2.8.3 Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan <i>Dot-Blot</i> .....	30
2.8.4 Analisis Peredaman Radikal DPPH.....	31
2.8.5 Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida.....	33
2.8.6 Analisis Peredaman Radikal Hidroksil.....	34
2.8.7 Analisis Penghambatan –Amilase.....	37
2.8.8 Analisis Penghambatan –Glukosidase.....	38
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan.....</b>	<b>41</b>
3.2.1 Alat.....	41
3.2.2 Bahan .....	41
<b>3.3 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>43</b>
3.3.1 Diagram Alir Penelitian.....	43
3.3.2 Prosedur Penelitian.....	44
a. Pembuatan Simplisia daun Bidara upas dan Kayu kuning.....	44
b. Ekstraksi Fenolik dari Simplisia Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	44
c. Analisis Total Fenolik Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	45
d. Analisis Total Flavonoid Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	45
e. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	46
f. Analisis <i>Dot-Blot</i> Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	46
g. Analisis Peredaman Radikal DPPH oleh Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	47
h. Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida oleh Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	47
i. Analisis Peredaman Radikal Hidroksil oleh Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	48
j. Analisis Penghambatan –Amilase oleh Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	48
k. Analisis Penghambatan –Glukosidase oleh Ekstrak	

Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	49
l. Kinetika Penghambatan -Amilase oleh Ekstrak yang Paling Berpotensi sebagai Antidiabetik.....	50
m. Kinetika Penghambatan -Glukosidase oleh Ekstrak yang Paling Berpotensi sebagai Antidiabetik.....	51
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1 Rendemen Maserasi Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2 Total Fenolik Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning....</b>	<b>55</b>
4.2.1 Total Fenolik Ekstrak Daun Bidara Upas.....	56
4.2.2 Total Fenolik Ekstrak Daun Kayu Kuning.....	57
<b>4.3 Total Flavonoid Ekstrak Daun Bidara Upas dan     Kayu Kuning.....</b>	<b>58</b>
4.3.1 Total Flavonoid Ekstrak Daun Bidara Upas.....	59
4.3.2 Total Flavonoid Ekstrak Daun Kayu Kuning.....	60
<b>4.4 Perbandingan Total Fenolik dan Flavonoid Ekstrak Daun     Bidara Upas dan Kayu Kuning.....</b>	<b>61</b>
<b>4.5 Kromatogram Ekstrak Daun Bidara Upas     dan Kayu Kuning.....</b>	<b>62</b>
<b>4.6 Potensi Antioksidan Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas     dan Kayu Kuning.....</b>	<b>65</b>
4.6.1 Hasil Analisis <i>Dot-Blot</i> Ekstrak Fenolik Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	66
4.6.2 Peredaman Radikal DPPH oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	68
a. Peredaman Radikal DPPH oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas.....	68
b. Peredaman Radikal DPPH oleh Ekstrak Fenolik Daun Kayu Kuning.....	70
4.6.3 Peredaman Radikal Anion Superoksida oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	71
a. Peredaman Radikal Anion Seperoksida oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas.....	72
b. Peredaman Radikal Anion Seperoksida oleh Ekstrak Fenolik Daun Kayu Kuning.....	72
4.6.4 Peredaman Radikal Hidroksil oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	74
a. Peredaman Radikal Hidroksil oleh Ekstrak Fenolik	

Daun Bidara Upas.....	74
b. Peredaman Radikal Hidroksil oleh Ekstrak Fenolik Daun Kayu Kuning.....	75
4.6.5 Perbandingan Peredaman Radikal DPPH, Anion Superoksida, dan Hidroksil oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	76
a. Perbandingan Peredaman Radikal DPPH, Anion Superoksida, dan Hidroksil oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas.....	76
b. Perbandingan Peredaman Radikal DPPH, Anion Superoksida, dan Hidroksil oleh Ekstrak Fenolik Daun Kayu Kuning.....	78
<b>4.7 Potensi Antidiabetik Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....</b>	<b>78</b>
4.7.1 Penghambatan -Amilase oleh Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	79
a. Persen Penghambatan -Amilase oleh Ekstrak Daun Bidara Upas.....	80
b. Persen Penghambatan -Amilase oleh Ekstrak Daun Kayu Kuning.....	81
4.7.2 Penghambatan -Glukosidase oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	82
a. Persen Penghambatan -Glukosidase oleh Ekstrak Daun Bidara Upas.....	82
b. Persen Penghambatan -Glukosidase oleh Ekstrak Daun Kayu Kuning.....	83
4.7.3 Perbandingan Persen Penghambatan -Amilase dan -Glukosidase oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	85
a. Perbandingan Persen Penghambatan -Amilase dan -Glukosidase oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upa.....	85
b. Perbandingan Persen Penghambatan -Amilase dan -Glukosidase oleh Ekstrak Fenolik Daun Kayu Kuning...	86
4.7.4 Kinetika Penghambatan -Amilase dan -Glukosidase oleh Ekstrak Etil Asetat Kayu Kuning (EKK).....	87
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>92</b>
<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>92</b>

<b>5.2 Saran .....</b>	<b>92</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>93</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>101</b>



## DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Pengelompokan diabetes melitus secara etiologi dan klinis .....	18
2.2 Standar penentuan diagnosis DM pada pasien.....	18
4.1 Rendemen maserasi ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning.....	54
4.2 Nilai <i>Retardation factor</i> (Rf) ekstrak daun Bidara upas dan Kayu kuning.....	64
4.3 Nilai $K_M$ dan $V_{max}$ -amilase dan -glukosidase.....	90

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Sketsa tanaman Kayu kuning.....	7
2.2 Struktur senyawa aktif Kayu kuning.....	8
2.3 Sketsa tanaman Bidara upas.....	8
2.4 Distribusi tanaman Bidara upas di dunia.....	9
2.5 Struktur umbeliveron dan kuersetin .....	10
2.6 Jalur biosintesis asam shikimat.....	11
2.7 Jalur biosintesis L-fenilalanin dan L-tirosin.....	11
2.8 Struktur asam kafeat dan asam kumarat.....	12
2.9 Jalur biosintesis fenilpropanoid.....	12
2.10 Struktur kimia lignan dan neolignan.....	13
2.11 Jalur biosintesis lignan dan lignin.....	13
2.12 Jalur biosintesis kumarin.....	14
2.13 Struktur dasar flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid.....	15
2.14 Jalur biosintesis flavonoid dan isoflavonoid.....	15
2.15 Struktur tanin terkondensasi dan terhidrolisis.....	16
2.16 Struktur insulin manusia.....	19
2.17 mekanisme reaksi hidrolisis oleh $\alpha$ -amilase.....	20
2.18 Prosentase homologi domain katalitik MGAM dan SI .....	21
2.19 Struktur inhibitor $\alpha$ -glukosidase sintetik.....	21
2.20 Residu katalitik MGAM dan S.....	22
2.21 Kurva pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi.....	23
2.22 Tiga tipe penghambatan enzim secara reversibel.....	24
2.23 Mekanisme reaksi autooksidasi glukosa.....	26
2.24 Reaksi BHA dan radikal bebas.....	26
2.25 Skema instrument spektrofotometer <i>single beam</i> .....	27
2.26 Kesetimbangan senyawa fenol oleh pengaruh pH.....	28
2.27 Reaksi pembentukan ion fenolat dari asam galat.....	29
2.28 Reaksi pembentukan warna dari kuersetin.....	30
2.29 Interaksi asam p-kumarat dengan silika gel dan DPPH .....	31
2.30 Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan.....	32
2.31 Reaksi autooksidasi pirogallol.....	33
2.32 Mekanisme reaksi peredaman radikal anion superoksida oleh kuersetin.....	34
2.33 Reaksi reduksi ion $Fe^{3+}$ oleh asam askorbat.....	35

2.34 Reaksi radikal hidroksil dengan 2-deoksi-D-ribosa.....	36
2.35 Reaksi pembentukan MDA-TBA <i>adduct</i> yang berwarna pink.....	36
2.36 Mekanisme reaksi peredaman radikal hidroksil oleh kuersetin.....	36
2.37 Reaksi reduksi DNS dengan gula pereduksi.....	37
2.38 Interaksi kuersetagetin dengan $\alpha$ -amilase.....	38
2.39 Reaksi hidrolisis maltosa oleh $\alpha$ -glukosidase.....	38
2.40 Reaksi oksidasi glukosa oleh glukosa oksidase.....	39
2.41 Sisi katalitik enzim glukosa oksidase dari <i>Penicillium</i> <i>amagasakiense</i> .....	39
2.42 Struktur 3D <i>horseradish peroxidase</i> .....	40
2.43 Reaksi oksidasi hidrogen peroksida oleh <i>horseradish peroxidase</i> .....	40
2.44 Mekanisme katalisis substrat oleh <i>horseradish peroxidase</i> .....	40
3.1 Kurva hasil pengeplotan antara waktu inkubasi dan konsentrasi produknya....	50
3.2 Kurva hasil pengeplotan antara waktu inkubasi dan konsentrasi produknya....	51
4.1 Sampel daun Bidara upas dan Kayu kuning.....	53
4.2 Total fenolik ekstrak daun Bidara upas.....	56
4.3 Total fenolik ekstrak daun Kayu kuning.....	55
4.4 Gugus fungsi flavonoid dengan aktivitas antioksidan yang tinggi.....	57
4.5 Total flavonoid ekstrak daun Bidara upas.....	58
4.6 Struktur 3,4 -dihidroksiflavon.....	59
4.7 Total flavonoid ekstrak daun Kayu kuning.....	61
4.8 Perbandingan total fenolik dan flavonoid ekstrak daun Bidara upas dan Kayu kuning.....	62
4.9 Kromatogram ekstrak fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning.....	63
4.10 Hasil analisis <i>dot-blot</i> ekstrak daun Bidara upas dan Kayu kuning.....	67
4.11 Nilai IC <sub>50</sub> radikal DPPH oleh ekstrak Bidara upas.....	68
4.12 Peran masing-masing gugus fungsi pada senyawa flavonoid.....	70
4.13 Nilai IC <sub>50</sub> radikal DPPH oleh ekstrak Kayu kuning.....	70
4.14 Persen peredaman radikal anion superoksida oleh ekstrak Bidara upas.....	72
4.15 Persen peredaman radikal anion superoksida oleh ekstrak Kayu kuning.....	73
4.16 Persen peredaman radikal hidroksil oleh ekstrak Bidara upas.....	75
4.17 Persen peredaman radikal hidroksil oleh ekstrak Kayu kuning.....	76
4.18 Perbandingan peredaman radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil oleh ekstrak Bidara upas.....	77
4.19 Perbandingan peredaman radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil oleh ekstrak Kayu kuning.....	78
4.20 Persen penghambatan $\alpha$ -amilase oleh ekstrak Bidara upas.....	80

4.21 Struktur kuersetin dan rutin.....	81
4.21 Persen penghambatan -amilase oleh ekstrak Kayu kuning.....	81
4.22 Persen penghambatan -glukosidase oleh ekstrak Bidara upas.....	83
4.23 Persen penghambatan -glukosidase oleh ekstrak Kayu kuning.....	84
4.24 Struktur kuersetin dan isokuersetin.....	84
4.25 Perbandingan persen penghambatan -amilase dan -glukosidase oleh ekstrak Bidara upas.....	85
4.26 Perbandingan persen penghambatan -amilase dan -glukosidase oleh ekstrak Bidara upas.....	86
4.27 Struktur bilobetin.....	87
4.28 Kurva Lineweaver Burk -amilase.....	89
4.29 Kurva Lineweaver Burk -glukosidase.....	89
4.30 Struktur inhibitor -amilase.....	91
4.31 Struktur inhibitor -glukosidase.....	91

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Validasi Tanaman Kayu Kuning dan Bidara Upas .....	101
2. Warna Ekstrak Bidara Upas dan Kayu Kuning.....	102
3. Perhitungan Rendemen Maserasi.....	102
4. Konsentrasi Ekstrak untuk Analisis Total Fenolik dan Flavonoid.....	102
5. Kurva Standar Asam Galat dan Total Fenolik Ekstra.....	103
6. Kurva Standar Kuersetin dan Total Flavonoid Ekstrak.....	104
7. Nilai <i>Retardation factor</i> (Rf) setiap <i>Spot</i> Kromatogram KLT.....	105
8. Nilai $IC_{50}$ Radikal DPPH.....	105
9. Persen Peredaman Radikal Anion Superoksida.....	107
10. Persen Peredaman Radikal Hidroksil.....	108
11. Persen Penghambatan -Amilase.....	109
12. Persen Penghambatan -Glukosidase.....	110
13. Kurva Standar Maltosa dan Nilai $V_0$ -Amilase.....	111
14. Kurva Standar Glukosa dan Nilai $V_0$ Reaksi Hidrolisis -Glukosidase.....	112
15. Nilai $K_M$ dan $V_{max}$ -Amilase dan -Glukosidase.....	113

## **BAB I. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Pola penyakit pada saat ini mulai bergeser dari penyakit infeksi ke arah sindrom metabolik. Diabetes melitus (DM) merupakan salah satu sindrom metabolik yang secara global prevalensinya tinggi. Prevalensi global DM usia 20 sampai 79 tahun sebesar 149 juta jiwa (5,1%) pada tahun 2003 dan diperkirakan mencapai 333 juta (6,3%) pada tahun 2025 (International Diabetes Federation, 2003). Menurut Balitbangkes (2013), prevalensi DM di Indonesia bagi penduduk usia 15 tahun ke atas pada pertengahan 2013 adalah 6,9%. Diabetes melitus menyebabkan berbagai komplikasi baik mikrovaskuler maupun makrovaskuler. Komplikasi makrovaskuler seperti kardiovaskuler merupakan penyebab utama kematian pada penderita DM (International Diabetes Federation, 2003).

Penyakit DM dicirikan dengan akumulasi glukosa dalam darah yang berlebih (hiperglikemia). Menurut Wolff (1993), glukosa dapat mengalami reaksi autooksidasi yang dikatalis oleh logam golongan transisi. Produk reaksi autooksidasi glukosa adalah senyawa oksigen reaktif seperti radikal anion superoksida, radikal hidroksil, dan hidrogen peroksida (Guigliano, 1996). Kenaikan produksi radikal bebas dalam tubuh merangsang stres oksidatif karena antioksidan di dalam tubuh tidak mampu mengatasi radikal bebas yang ada. Akibatnya terjadi kerusakan organel sel, kenaikan peroksidasi lipid, dan meningkatkan resistensi insulin. Hal ini yang menyebabkan munculnya berbagai komplikasi pada penderita DM (Maritim *et al.*, 2003).

Upaya untuk mengatasi DM dan komplikasinya dapat dilakukan dengan mengatur pola hidup. Tetapi jika upaya ini tidak berhasil maka terapi farmakologis diperlukan. Pengobatan DM membutuhkan waktu yang lama sehingga efek samping yang mungkin timbul tidak dapat diabaikan. Menurut Sudha *et al.* (2011), beberapa efek samping obat antidiabetik sintetis pada gastrointestinal adalah kembung, mual, diare, dan flatulensi. Antioksidan sintetis seperti butil hidroksianisol (BHA) dan butil

hidroksitoluena (BHT) juga memiliki efek toksikologi dan karsinogenik (Nadheesha *et al.*, 2007). Selain itu obat-obat sintetis pada umumnya hanya bekerja melalui satu mekanisme, misalnya golongan statin hanya menghambat HMG-CoA reduktase (Istvan, 2003). Sehingga banyak penelitian diarahkan untuk terapi menggunakan bahan alami agar terhindar dari efek samping tersebut. Bahan alami mengandung beberapa senyawa aktif yang kemungkinan bekerja melalui mekanisme yang berbeda dan memiliki efek sinergis, sehingga diharapkan aktivitas farmakologinya menjadi lebih baik.

Prevalensi global diabetes melitus tipe 2 diperkirakan menempati posisi tertinggi. Menurut International Diabetes Federation (2003), sebanyak 85-95% dari semua penderita DM adalah penderita DM tipe 2. Perkembangan DM tipe 2 dapat dianalisis melalui hiperglikemia *postprandial*, yaitu kadar glukosa darah setelah makan. Salah satu pendekatan terapeutik yang bisa dilakukan untuk mengontrol DM tipe 2 dan komplikasinya adalah mengontrol kadar glukosa *postprandial* (You *et al.*, 2011).

Hiperglikemia *postprandial* dapat dikontrol dengan menghambat  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase.  $\alpha$ -amilase di air liur dan pankreas akan menghidrolisis polisakarida menjadi oligosakarida yang akan dihidrolisis lebih lanjut oleh  $\alpha$ -glukosidase di membran *brush border* intestinal menjadi glukosa. Glukosa yang telah terbentuk akan diabsorpsi oleh epitelium intestinal dan masuk ke peredaran darah (Feng *et al.*, 2011). Akibatnya kadar glukosa darah terus meningkat jika aktivitas kedua enzim tersebut tidak dihambat. Menurut Feng *et al.* (2011), telah banyak ditemukan inhibitor alami yang berasal dari sumber tanaman. Kombinasi penghambatan enzim dan antioksidan akan memiliki efek farmakologis yang saling mendukung dalam terapi DM dan komplikasinya (Shabeer *et al.*, 2009).

Kawasan Taman Nasional Meru Betiri (TNMB) hingga saat ini memiliki jumlah flora yang telah teridentifikasi sebanyak 518 jenis. Sebanyak 239 jenis diantaranya seperti Bidara upas dan Kayu kuning merupakan bahan baku obat tradisional (Balai Taman Nasional Meru Betiri, 2014). Potensi keanekaragaman flora

TNMB sebagai obat untuk mencegah dan mengobati sindrom metabolik perlu digali. Universitas Jember memiliki kepentingan untuk menggali dan mengembangkan potensi yang ada di TNMB sebagai salah satu bentuk Tri Dharma Perguruan Tinggi.

Bidara upas digunakan untuk mengobati demam, batuk, diabetes melitus, dan kanker (Ramuan Jamu Nusantara dan Pengobatan, 2014). Masyarakat Kalimantan menggunakan Kayu kuning sebagai obat untuk malaria, disentri, dan demam (Subeki *et al.*, 2004). Menurut Keawpradub *et al.* (2005), triakontanil kafeat yang diisolasi dari Kayu kuning terbukti sebagai antioksidan. Potensi Bidara upas sebagai antidiabetik kemungkinan berasal dari senyawa fenolik karena ekstrak fenolik dari *Cuscuta reflexa* yang masih satu famili dengan Bidara upas diketahui memiliki potensi sebagai antidiabetik (Patel *et al.*, 2012). Triakontanil kafeat yang diisolasi dari Kayu kuning juga termasuk senyawa fenolik, sehingga perlu dianalisis potensi ekstrak fenolik dari Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antidiabetik dan antioksidan.

Senyawa fenolik pada tumbuhan tingkat tinggi secara umum terdegradasi pada suhu tinggi (Biesaga dan Pyrzynska, 2013 dan Pardo *et al.*, 2011). Kepolarannya juga beragam karena memiliki struktur yang beragam dan memiliki kemampuan mengompleks dengan protein, karbohidrat, dan senyawa-senyawa lain (Khoddami *et al.*, 2013). Maserasi bertingkat dipilih untuk mengekstrak senyawa fenolik yang secara umum terdegradasi pada suhu tinggi dan memiliki kepolaran yang beragam. Potensi ekstrak fenolik sebagai antidiabetik dianalisis dengan penghambatan -amilase dan -glukosidase, sedangkan potensinya sebagai antioksidan dengan peredaman radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil. Mekanisme penghambatan enzim oleh ekstrak fenolik yang paling berpotensi sebagai antidiabetik ditentukan melalui kinetika penghambatannya.



## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah yang dapat diambil dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana potensi ekstrak fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antioksidan?
2. Bagaimana potensi ekstrak fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antidiabetik?
3. Bagaimana kinetika penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak yang paling berpotensi sebagai antidiabetik?

## **1.3 Batasan Masalah**

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Daun Bidara upas dan Kayu kuning yang digunakan sebagai sampel diambil di Taman Nasional meru Betiri, Kabupaten Jember secara acak
2. Analisis kinetika penghambatan enzim hanya dilakukan pada ekstrak fenolik yang paling berpotensi sebagai antidiabetik

## **1.4 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui potensi ekstrak fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antioksidan
2. Mengetahui potensi ekstrak fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antidiabetik
3. Mengetahui mekanisme penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase oleh senyawa aktif dalam ekstrak yang paling berpotensi sebagai antidiabetik

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat untuk:

1. Memberikan informasi yang bermanfaat bagi masyarakat dan peneliti terhadap potensi ekstrak daun Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antidiabetik dan antioksidan
2. Memberikan informasi pengaruh jenis pelarut yang digunakan terhadap nilai rendemen dan potensinya sebagai antidiabetik dan antioksidan
3. Memberikan informasi perbandingan potensi dari daun Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antidiabetik dan antioksidan
4. Memberikan informasi mekanisme penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak yang paling berpotensi sebagai antidiabetik

## **BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA**

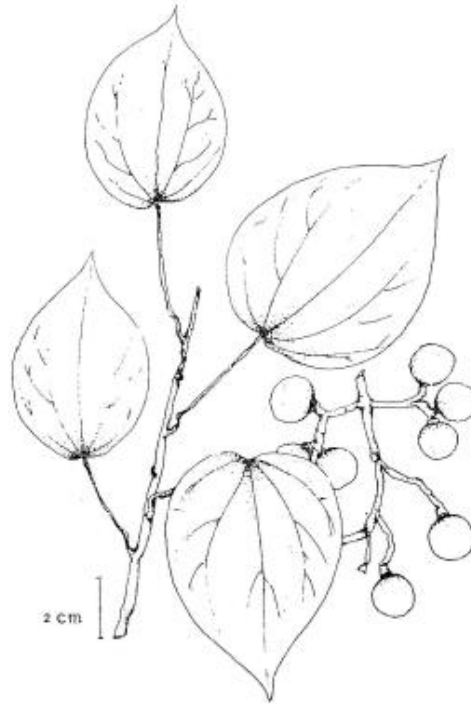
Kawasan Taman Nasional Meru Betiri (TNMB) secara administratif terletak di kabupaten Jember dan Banyuwangi dengan luas total 58.000 Ha. Kawasan tersebut terdiri dari perairan dengan luas 845 Ha dan 57.155 Ha daratan. Berdasarkan Surat Keputusan Menteri Kehutanan Nomor: 277/Kpts-VI/1997 tanggal 23 Mei 1997 dari 58.000 Ha tersebut 37.585 Ha berada di Kabupaten Jember dan 20.415 Ha di kabupaten Banyuwangi. Jumlah flora yang telah teridentifikasi di TNMB hingga saat ini sebanyak 518 jenis dan 239 jenis diantaranya merupakan bahan baku obat tradisional seperti Kayu kuning dan Bidara upas (Balai Taman Nasional Meru Betiri, 2014).

### **2.1 Deskripsi Kayu Kuning dan Bidara Upas**

Kayu kuning dan Bidara Upas termasuk jenis tanaman liana. Tanaman liana memiliki ciri umum batang tidak berkayu sehingga tidak mampu menopang bagian tubuh yang lain. Akibatnya tanaman ini hidupnya merambat ditanah atau melilit ke tanaman lain.

#### **2.1.1 Kayu kuning (*Arcangelisia flava*)**

Panjang batang Kayu kuning bisa mencapai  $\pm 10$  m, berwarna kuning dan berasa pahit. Daunnya berbentuk lonjong dan meruncing di bagian ujungnya. Permukaan daunnya berwarna hijau mengkilat. Bunganya terdapat pada batang tua dan ketiak daun dengan warna kuning pucat. Pada batang dan cabang-cabang yang besar terdapat tandan buah yang menggantung. Buahnya berwarna kuning yang terdiri atas daging buah yang berlendir dan bijinya besar yang berbentuk pipih (Mandia *et al.*, 1999). Sketsa tanaman Kayu kuning ditunjukkan oleh Gambar 2.1.

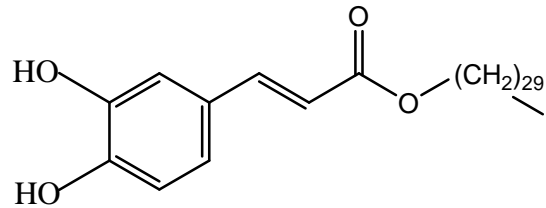


Gambar 2.1 Sketsa tanaman Kayu kuning (Jawvachdamrongkul *et al.*, 1993)

Menurut Plantamor (2012), taksonomi tanaman Kayu kuning adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Magnoliidae
Ordo	: Ranunculales
Famili	: Menispermaceae
Genus	: <i>Arcangelisia</i>
Spesies	: <i>flava</i> Merr

Triakontanil kafeat berhasil diisolasi dari batang kayu kuning dan berpotensi sebagai antioksidan. Menurut Keawpradub *et al.* (2005), triakontanil kafeat mampu menurunkan 50% aktivitas radikal DPPH pada konsentrasi 6,8 ppm. Gambar 2.2 merupakan struktur triakontanil kafeat.



Gambar 2.2 Struktur senyawa aktif Kayu kuning (Kewpradub *et al.*, 2005)

### 2.1.2 Bidara Upas (*Merremia mammosa*)

Bidara upas memiliki umbi yang panjangnya bisa mencapai 25 cm. Panjang batangnya mencapai 3-6 meter yang merayap atau membelit. Daunnya tunggal, bertangkai panjang, ujung meruncing, berbentuk jantung, panjang 5-12 cm, lebar 4-15 cm dan berwarna hijau tua. Habitatnya di hutan karena dapat tumbuh dengan liar dan terkadang ditanam di dekat pagar karena umbinya dapat dimakan. Tanaman ini tumbuh dengan baik di dataran rendah sampai ketinggian 200 m di atas permukaan laut yang beriklim tropis. Sketsa tanaman Bidara upas ditunjukkan oleh Gambar 2.3.

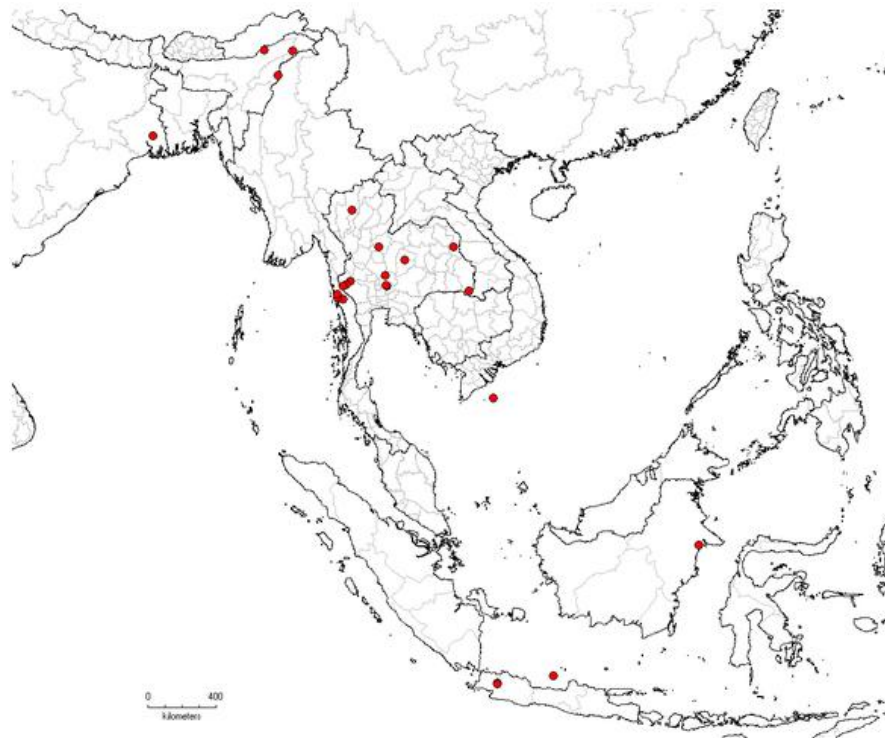


Gambar 2.3 Sketsa tanaman Bidara upas (Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, 2014)

Menurut Plantamor (2012), taksonomi tanaman Bidara upas adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Solanales
Famili	: Convolvulaceae
Genus	: <i>Merremia</i>
Spesies	: <i>mammosa</i> Chois

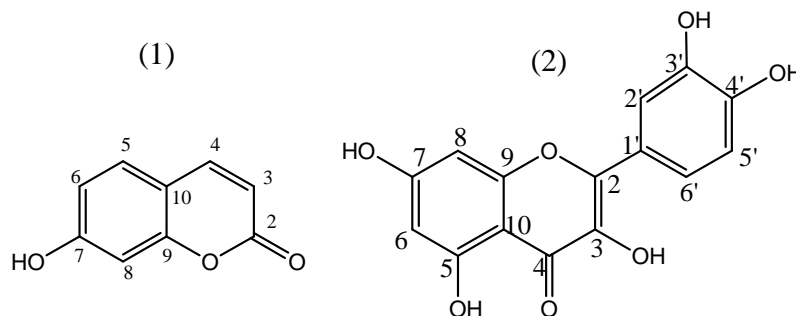
Sebaran Bidara upas di dunia meliputi Indonesia, India, Myanmar, Thailand, dan Vietnam. Gambar 2.4 menunjukkan distribusi Bidara upas di dunia yang ditunjukkan dengan titik-titik merah pada peta. Menurut Patel *et al.* (2012), ekstrak fenolik dari *Cuscuta reflexa* yang masih satu famili dengan *Merremia mammosa* berpotensi sebagai antidiabetik.



Gambar 2.4 Distribusi tanaman Bidara upas di dunia (Singapore Botanic Gardens, 2011)

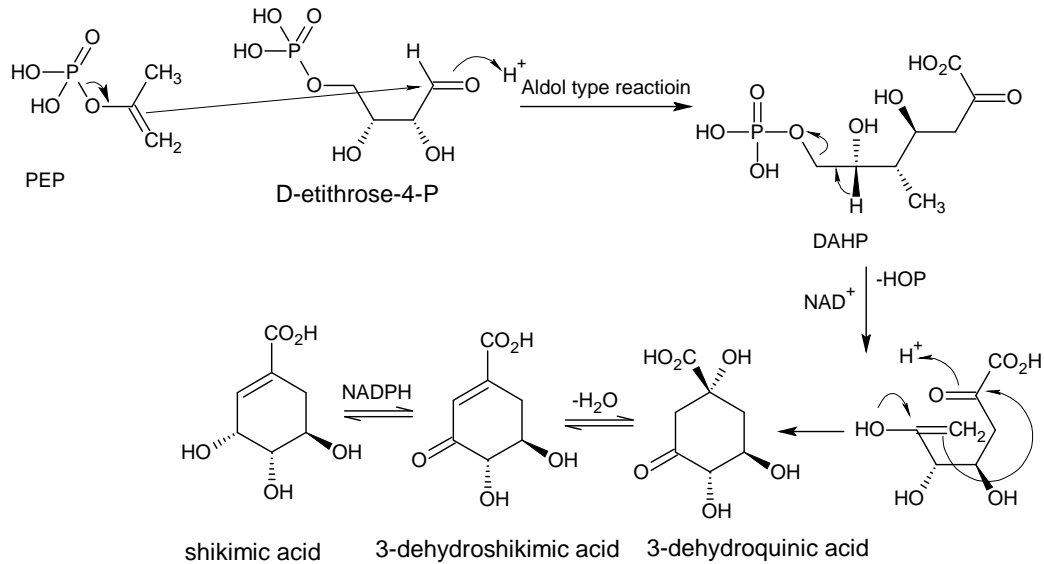
## 2.2 Senyawa Fenolik

Senyawa aktif yang terdapat dalam tanaman Bidara upas dan Kayu kuning kemungkinan berasal dari golongan fenolik. Fenolik merupakan salah satu kelompok besar senyawa metabolit sekunder yang umumnya dijumpai pada tanaman tingkat tinggi. Menurut Sarker & Nahar (2007), senyawa fenolik memiliki karakteristik satu atau lebih gugus hidroksil fenolik pada strukturnya. Umbeliveron merupakan contoh senyawa fenolik dengan satu gugus hidroksil fenolik pada C-7 sedangkan kuersetin memiliki empat gugus hidroksil fenolik di C-5, C-7, C-3', dan C-4'. Struktur umbeliveron dan kuersetin ditunjukkan oleh Gambar 2.5.

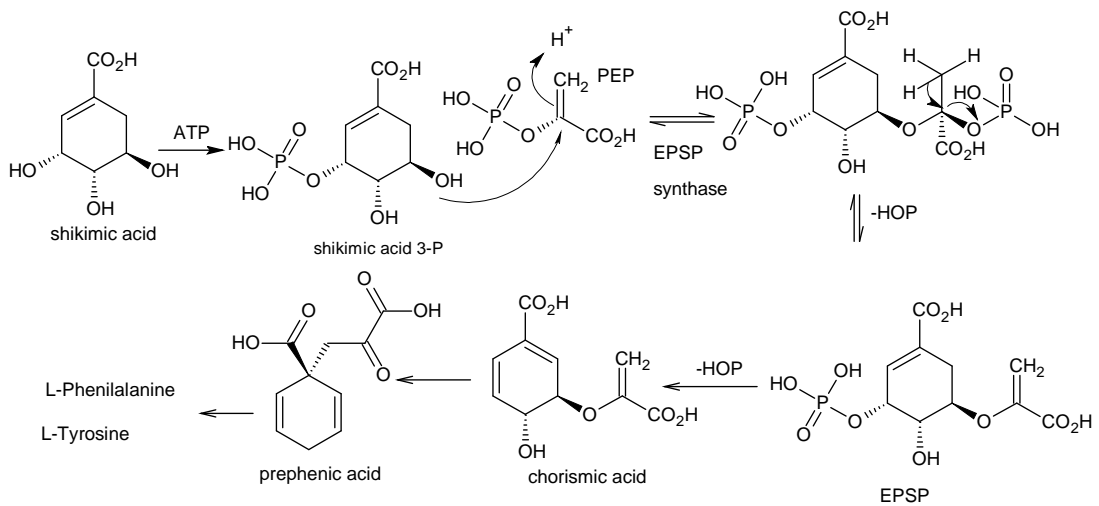


Gambar 2.5 Struktur umbeliveron (1) dan kuersetin (2) (Sarker & Nahar, 2007)

Jalur utama biosintesis senyawa fenolik melalui senyawa intermediet asam shikimat, sehingga dikenal jalur shikimat. Menurut Dewick (2002), asam shikimat disintesis dari senyawa intermediet glikolisis (fosfoenolpiruvat) dan eritrosa 4-fosfat dari jalur pentosa fosfat. Biosintesis asam shikamat ditunjukkan oleh Gambar 2.6. Asam shikimat bereaksi lebih lanjut dengan fosfoenolpiruvat menghasilkan fenilalanin dan tirosin (Gambar 2.7). Asam amino fenilalanin dan tirosin merupakan prekursor biosintesis senyawa fenolik seperti lignan, lignin, dan fenilpropanoid.



Gambar 2.6 Jalur biosintesis asam shikimat (Dewick, 2002)



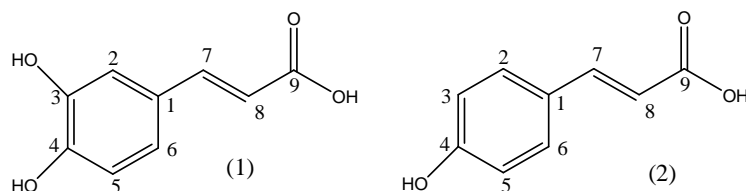
Gambar 2.7 Jalur biosintesis L-fenilalanin dan L-tirosin (Dewick, 2002)

### 2.2.1 Fenilpropanoid

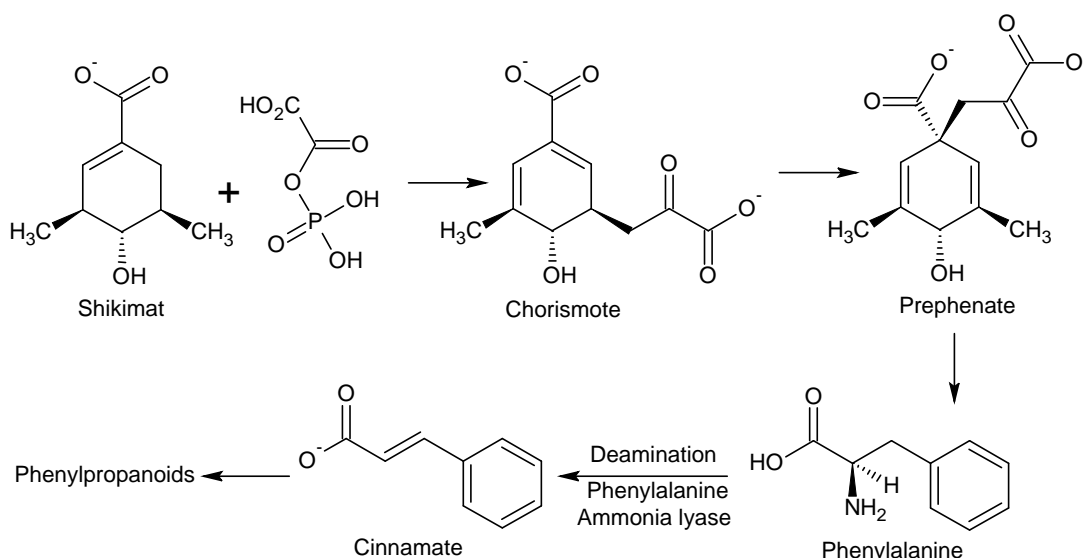
Fenilpropanoid adalah senyawa aromatik dengan substituen propil yang diturunkan langsung dari fenilalanin. Fenilpropanoid yang memiliki substituen hidroksil pada cincin benzenanya merupakan senyawa fenolik, seperti asam kafeat dan asam kumarat (Sarker & Nahar, 2007). Struktur asam kafeat dan asam kumarat



ditunjukkan oleh Gambar 2.8. Jalur biosintesis fenilpropanoid dari asam shikimat ditunjukkan oleh Gambar 2.9.



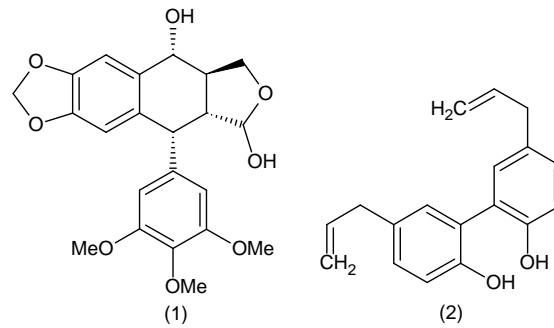
Gambar 2.8 Struktur asam kafeat (1) dan asam kumarat (2) (Sarker & Nahar, 2007)



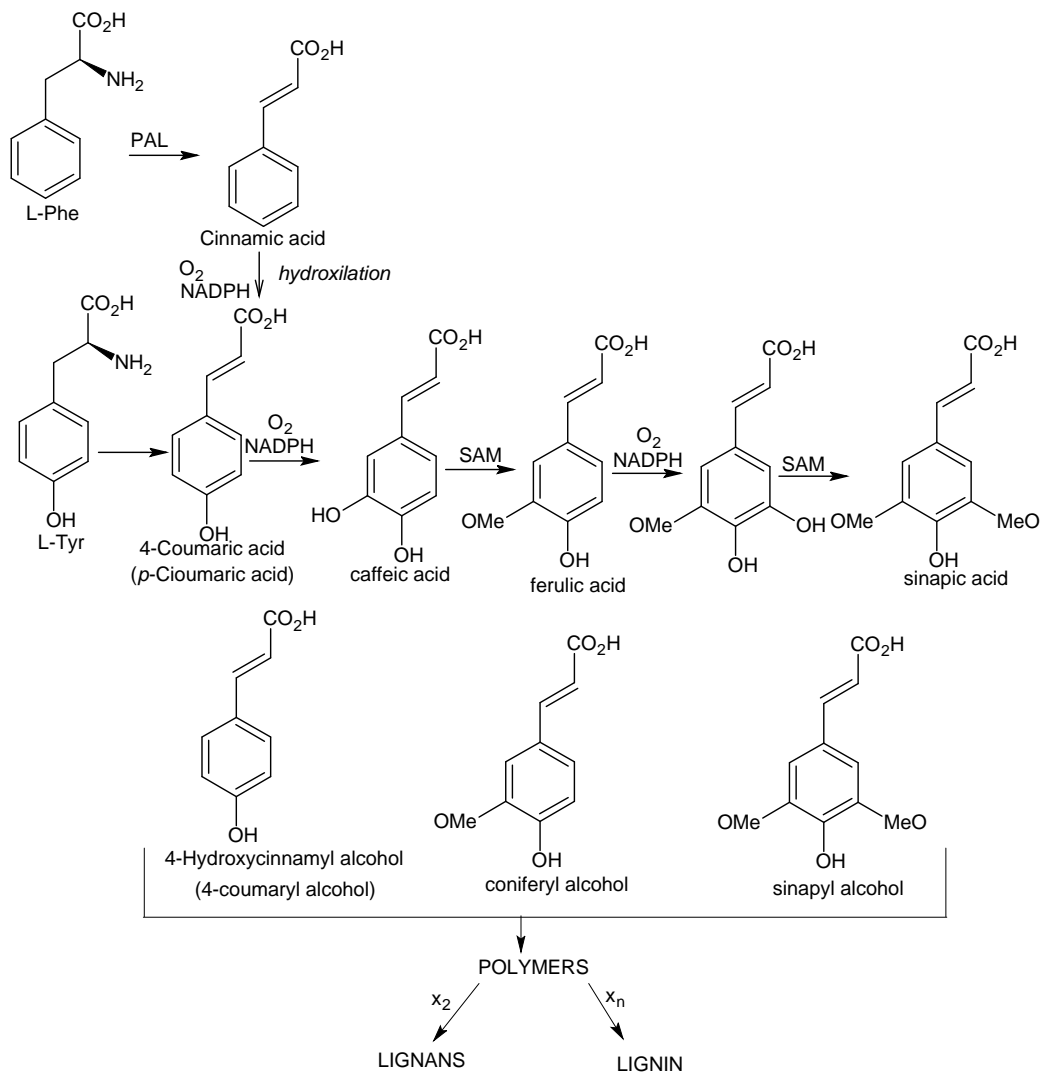
Gambar 2.9 Jalur biosintesis fenilpropanoid (Dewick, 2002)

### 2.2.2 Lignan dan neolignan

Lignan dan neolignan merupakan senyawa fenolik yang berbentuk dimer. Lignan dibentuk melalui ikatan C-C atau C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> dari fenilpropana koniferil alkohol, sedangkan neolignan selain itu. *Podophyllotoxin* merupakan salah satu contoh lignan yang aktif sebagai antitumor. Magnalol adalah bioaktif neolignan dari spesies *Magnolia* (Sarker & Nahar, 2007). Gambar 2.10 merupakan struktur *podophyllotoxin* dan magnalol. Jalur biosintesis lignan dan lignin ditunjukkan oleh Gambar 2.11.



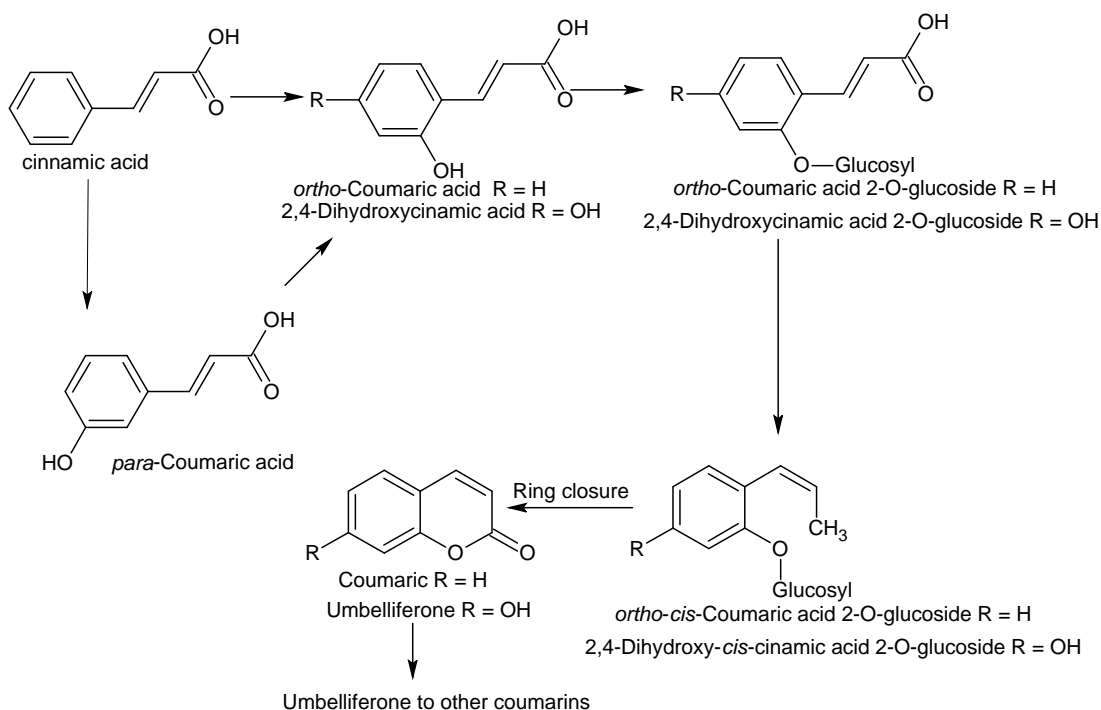
Gambar 2.10 Struktur *podophyllotoxin* (1) dan *magnalol* (2) (Sarker & Nahar, 2007)



Gambar 2.11 Jalur biosintesis lignan dan lignin (Dewick, 2002)

### 2.2.3 Kumarin

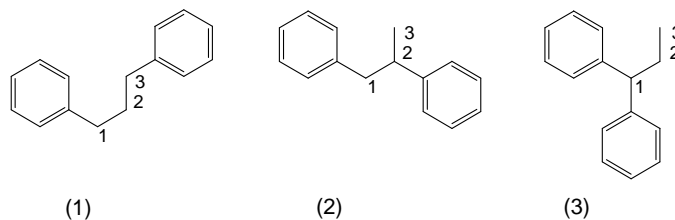
Kumarin merupakan kelas terbesar turunan dari 1-benzopiran yang ditemukan di tanaman tingkat tinggi. Hampir semua golongan kumarin memiliki atom oksigen pada C-7 seperti umbeliveron (7-hidroksikumarin). Umbeliveron dianggap sebagai induk biogenesis kumarin dengan atom oksigen lebih tinggi (Sarker & Nahar, 2007). Jalur biosintesis kumarin ditunjukkan Gambar 2.12.



Gambar 2.12 Jalur biosintesis kumarin (Dewick, 2002)

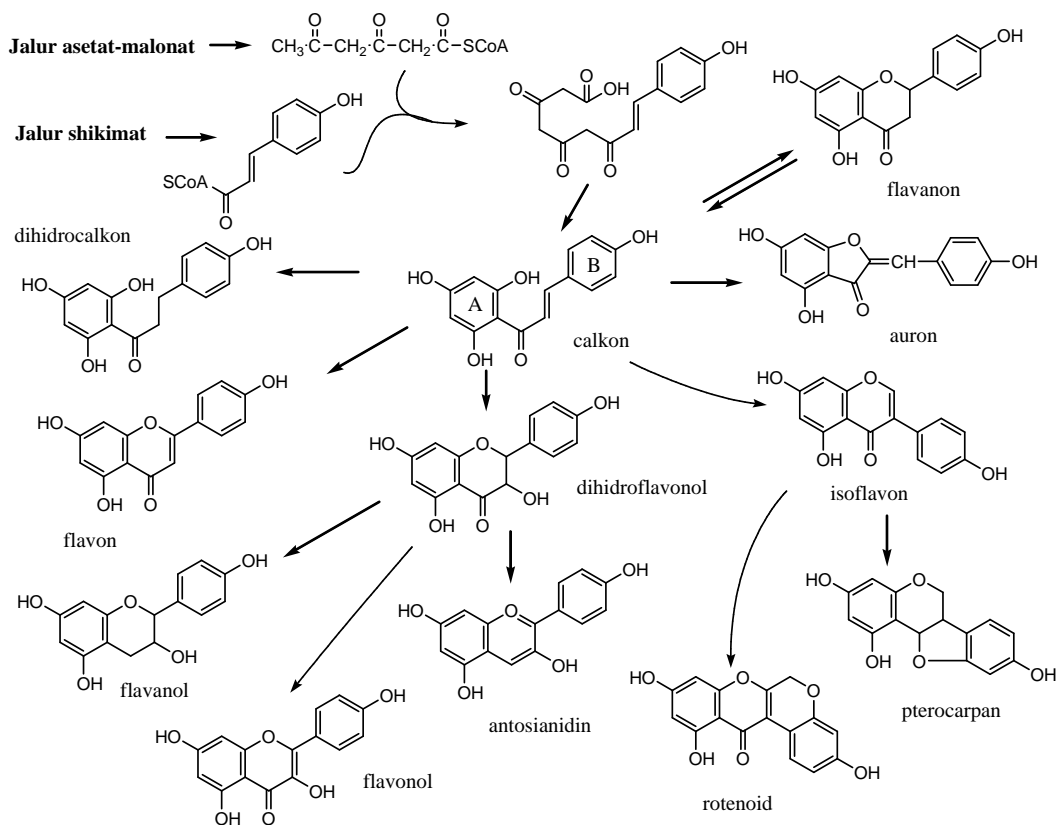
### 2.2.4 Flavonoid

Flavonoid diturunkan dari 1,3-difenilpropana dengan kerangka dasar C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Isoflavonoid dan neoflavonoid juga diturunkan dari kerangka dasar tersebut. Isoflavonoid diturunkan dari 1,2-difenilpropana dan neoflavonoid dari 1,1-difenilpropana. Struktur dasar flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid ditunjukkan oleh Gambar 2.13.



Gambar 2.13 Struktur dasar flavonoid (1), isoflavonoid (2), dan neoflavonoid (3)

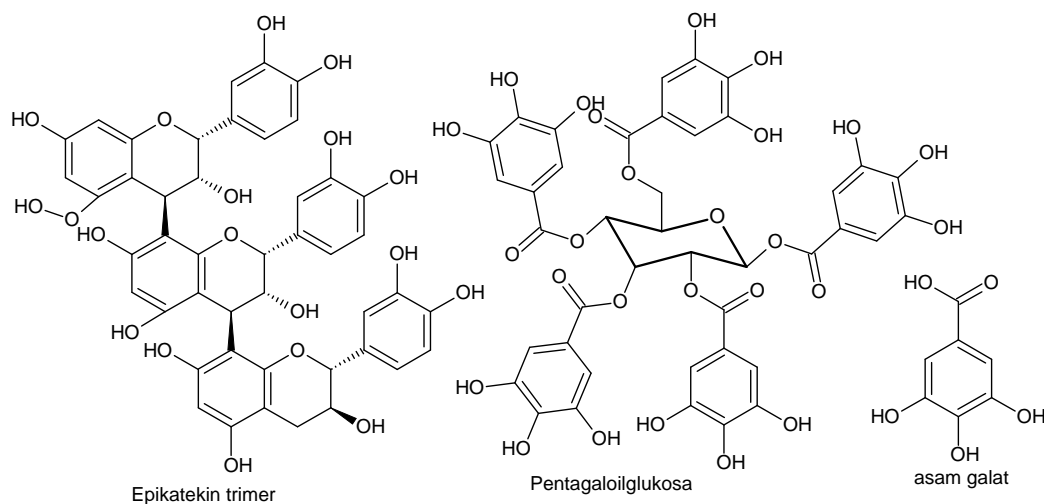
Flavonoid terdiri dari dua cincin aromatik. Gugus sinamoil (cincin B) berasal dari jalur asam shikimat dan gugus benzoilnya (cincin A) dari jalur asetat-malonat. Menurut Sarker & Nahar (2007), hampir semua flavonoid berbentuk glikosida, sehingga dikenal istilah monoglikosidat, diglikosidat dan seterusnya bergantung pada jumlah gula yang diikatnya. Jalur biosintesis flavonoid dan isoflavonoid ditunjukkan oleh Gambar 2.14.



Gambar 2.14 Jalur biosintesis flavonoid dan isoflavonoid

### 2.2.5 Tanin

Tanin merupakan polifenol yang digunakan oleh tanaman sebagai perlindungan dari serangan mikroba. Tanin membentuk warna biru gelap atau kehijau-hijauan dalam air ketika bereaksi dengan garam besi ( $\text{FeCl}_3$ ). Tanin dikelompokkan ke dalam dua kelas utama, yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terhidrolisis akan pecah menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana ketika ditambahkan asam atau enzim tertentu. Sedangkan tanin terkondensasi menghasilkan produk yang kompleks dan tidak larut dalam air. Pentagalailglukosa merupakan salah satu jenis tanin terhidrolisis dan Epikatekin trimer merupakan contoh tanin terkondensasi. Produk hidrolisis pentagalailglukosa adalah asam galat dan gula (Sarker & Nahar, 2007). Struktur tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi ditunjukkan oleh Gambar 2.15.



Gambar 2.15 Struktur tanin terkondensasi dan terhidrolisis (Sarker & Nahar, 2007)

### 2.3 Ekstraksi Bioaktif

Ekstraksi adalah istilah yang digunakan dalam *pharmaceutically* yang melibatkan pemisahan senyawa aktif obat dari jaringan tanaman atau binatang dengan pelarut tertentu sesuai prosedur standar ekstraksi. Standarisasi prosedur ekstraksi

bertujuan untuk mendapatkan efek farmakologis yang sesuai dengan mengeliminasi material inert menggunakan pelarutan yang selektif (*menstruum*). Maserasi merupakan salah satu metode dalam ekstraksi yang menggunakan suhu ruang. Pada proses ini, simplisia (serbuk tanaman) ditempatkan dalam wadah tertutup dan *menstruum* ditambahkan ke dalamnya. Setelah itu dibiarkan pada suhu ruang selama minimal 3 hari sambil digerak-gerakan sehingga pelarut dapat mengekstrak senyawa target dengan maksimal (ICS-UNIDO, 2008).

Metode ekstraksi senyawa fenolik tanaman harus memperhatikan beberapa aspek yang menentukan keberhasilannya. Struktur senyawa target, polaritas, konsentrasi, jumlah cincin aromatik dan gugus hidroksil merupakan aspek-aspek yang harus diperhatikan. Ekstraksi senyawa fenolik umumnya dilakukan dengan menggunakan pelarut, baik organik maupun anorganik. Beberapa parameter yang harus diperhatikan untuk mendapatkan ekstrak fenolik yang tinggi meliputi waktu ekstraksi, suhu, perbandingan sampel dan pelarut, jumlah pengulangan ekstraksi, dan jenis pelarut yang digunakan. *Optimum recovery* senyawa fenolik juga ditentukan oleh kandungan senyawa fenolik dari tanaman yang diekstrak (Gracia-Salas *et al.*, 2010).

Menurut Sarker & Nahar (2007), hampir semua senyawa fenolik yang telah teridentifikasi memiliki aktivitas antioksidan terutama peredaman radikal bebas dan beberapa diantaranya juga berpotensi sebagai antidiabetik dalam menghambat -amilase dan -glukosidase.

## **2.4 Diabetes Melitus**

Diabetes melitus dikenal sebagai kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik umum hiperglikemia yang disebabkan oleh kelainan sekresi insulin, kerja insulin, atau kedua-duanya (American Diabet Association, 2010). Menurut International Diabetes Federation (2003), diabetes melitus diklasifikasikan berdasarkan etiologi dan klinis menjadi empat tipe. Empat tipe DM berdasarkan etiologi dan klinis ditampilkan oleh Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Pengelompokan diabetes melitus secara etiologi dan klinis

Tipe 1	Destruksi sel beta umumnya mengarah ke defisiensi insulin absolut - Autoimun - Idiopatik
Tipe 2	Bervariasi, mulai yang didominasi resistensi insulin yang disertai defisiensi insulin relatif sampai defek sekresi insulin disertai resistensi insulin
Gestasional	
Tipe-tipe lain	- Defek genetik fungsi sel beta - Defek genetik kerja insulin - Penyakit eksoktrin pancreas - Infeksi - Karena obat kimia - Imunoglobulin yang jarang - Sindrom genetik lain yang berkaitan dengan DM

Sumber: Perkeni (2010).

Diagnosis diabetes melitus didasarkan pada kadar glukosa darah. Metode pemeriksaan kadar glukosa darah yang dianjurkan adalah menggunakan enzim dan bahan darah plasma vena. Tabel 2.2 merupakan standar yang digunakan dalam mengklasifikasikan DM.

Tabel 2.2 Standar penentuan diagnosis DM pada pasien

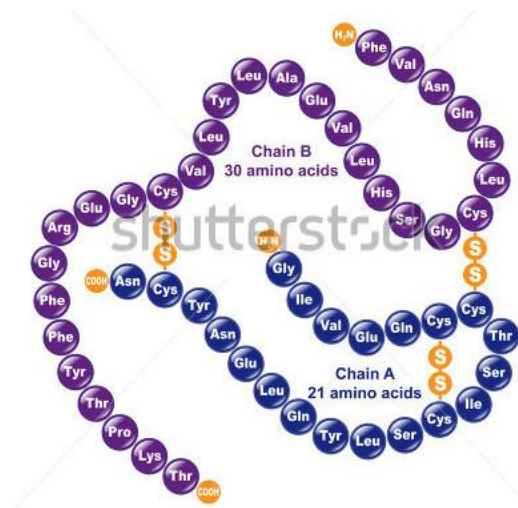
		Bukan DM	Belum Pasti DM	DM
Kadar glukosa darah sewaktu (mg/dL)	Plasma vena	<100	100-199	200
	Darah kapiler	<90	90-199	200
Kadar glukosa darah puasa (mg/dL)	Plasma vena	<100	100-125	126
	Darah kapiler	<90	90-99	100

Sumber: Perkeni (2010).

Faktor utama penyebab DM belum diketahui dengan pasti, namun para peneliti meyakini bahwa resistensi insulin berperan penting dalam perkembangannya. Menurut Shulman (2000), terdapat tiga bukti kuat yang mendukung hipotesa tersebut. Pertama, sebelum penyakit ini timbul sudah terjadi resistensi insulin selama 10-20

tahun. Kedua, penelitian lintas seksi menunjukkan bahwa resistensi insulin berkompeten pada penderita DM tipe 2. Ketiga, resistensi insulin merupakan prediktor terbaik resiko DM tipe 2 berdasarkan studi prospektif.

Insulin merupakan hormon peptida yang mengatur gula darah. Hormon insulin dihasilkan oleh sel pankreas yang diangkut oleh darah menuju organ lain, seperti otot dan hati. Insulin mengandung dua rantai polipeptida yang terdiri dari 21 dan 30 residu asam amino yang dihubungkan melalui jembatan disulfida. Gambar 2.16 adalah struktur insulin manusia.



Gambar 2.16 Struktur insulin manusia (Shutterstock, 2014)

Hiperglikemia akibat resistensi insulin dapat diminimalisir melalui penghambatan enzim-enzim yang terlibat dalam reaksi pembentukan glukosa. Glukosa dibentuk melalui kerja sekumpulan enzim yang saling melengkapi dan berurutan.  $\alpha$ -amilase dan  $\beta$ -glukosidase merupakan dua enzim utama yang menghidrolisis polisakarida menjadi glukosa.

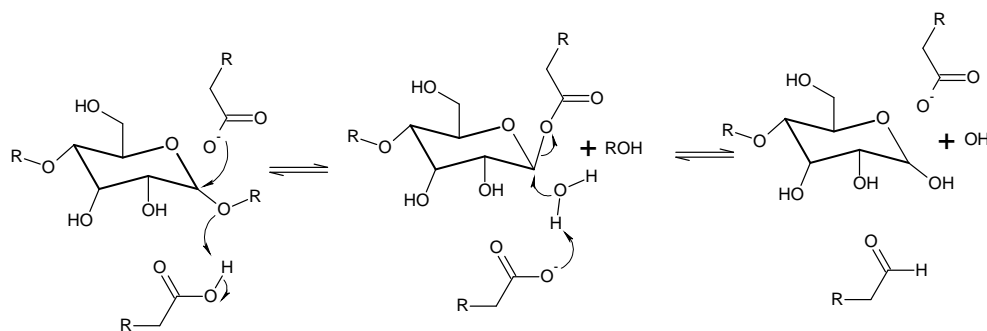
Polisakarida yang merupakan salah satu sumber gizi akan dipecah menjadi oligosakarida oleh  $\alpha$ -amilase di air liur dan pankreas. Produk hidrolisis  $\alpha$ -amilase akan diteruskan sampai di usus kecil. Disakarida seperti maltosa dengan ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosida, isomaltosa dengan  $\alpha$ -1,6-glikosida dan sukrosa dengan  $\alpha$ -1,2-glikosida



akan dipecah menjadi monosakarida oleh  $\alpha$ -glukosidase di membran *brush border* usus kecil (Nakamura *et al.*, 2012). Monosakarida seperti glukosa yang telah terbentuk akan diabsorpsi oleh epitelium intestinal dan masuk ke peredaran darah (Feng *et al.*, 2011).

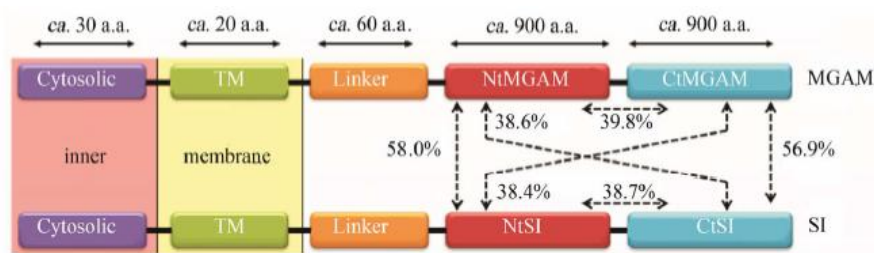
$\alpha$ -Amilase ( $\alpha$ -1,4-glukan-4-glukanohidrolase; E.C. 3.2.1.1) adalah salah satu produk utama yang dikeluarkan kelenjar pankreas (5-6%) dan saliva.  $\alpha$ -amilase berperan penting dalam pemecahan amilum dan glikogen.  $\alpha$ -amilase merupakan famili endoamilase yang mengkatalisis reaksi awal hidrolisis amilum menjadi oligosakarida melalui pemutusan ikatan  $\alpha$ -D-(1-4) glikosida. Produk akhir reaksi hidrolisis  $\alpha$ -amilase merupakan campuran maltosa, maltotriosa, dan oligosakaridan yang tersusun oleh 6-8 unit-unit glukosa yang mengandung ikatan baik  $\alpha$ -1,4 maupun  $\alpha$ -1,6 (Sales *et al.*, 2012).

$\alpha$ -Amilase manusia memiliki 512 asam amino dengan berat molekul 57,6 kDa yang struktur 3 dimensinya distabilkan oleh kalsium.  $\alpha$ -amilase memiliki 3 domain, domain A yang memiliki lipatan *barrel* ( $\beta$  /  $\alpha$ )<sub>8</sub> merupakan tempat residu katalitiknya. Residu katalitik  $\alpha$ -amilase adalah Asp<sup>197</sup>, Glu<sup>233</sup>, dan Asp<sup>300</sup>. Residu Asp<sup>197</sup> bertindak sebagai nukleofil yang akan menyerang substrat pada pusat anomernya dan menghasilkan ikatan kovalen. Molekul air akan menyerang pusat anomerik substrat untuk memutus ikatan kovalen antara Asp<sup>197</sup> dan substrat. Glu<sup>233</sup> dan Asp<sup>300</sup> berperan sebagai katalis asam dan basa selama reaksi tersebut (Sales *et al.*, 2012). Gambar 2.17 menunjukkan mekanisme reaksi hidrolisis oleh  $\alpha$ -amilase.



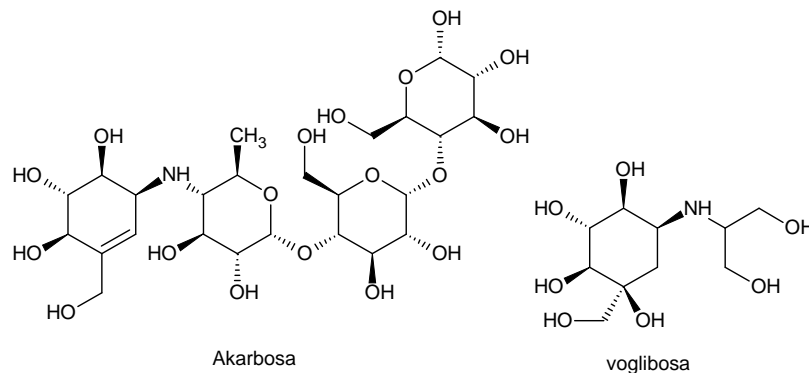
Gambar 2.17 mekanisme reaksi hidrolisis oleh  $\alpha$ -amilase (Janecek, 2009)

–Glukosidase di usus manusia terdiri dari dua jenis, yaitu maltase-glukoamilase (MGAM) dan sukrase-isomaltase (SI) yang memiliki dua domain katalitik pada ujung N-terminal (NtMGAM, NtSI) dan C-terminal (CtMGAM, CtSI) (Ernest *et al.*, 2006). Keempat domain katalitik tersebut mirip dan setiap domainnya dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis maltosa pada ikatan alfa-1,4 glikosida. NtSI juga mengkatalisis reaksi hidrolisis isomaltosa dan CtSI sukrosa (Gray *et al.*, 1979). Kemiripan empat domain dari MGAM dan SI ditampilkan oleh Gambar 2.18.



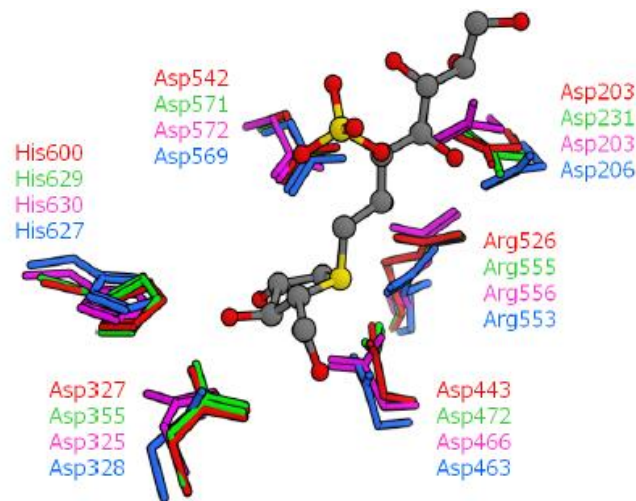
Gambar 2.18 Presentase homologi domain katalitik MGAM dan SI (Gray *et al.*, 1979)

Akarbosa dan voglibosa merupakan inhibitor sintetik –glukosidase yang digunakan untuk terapi diabetes melitus. Menurut Andrade *et al.* (1998), kedua jenis inhibitor tersebut menyebabkan *abdominal discomfort* dan *hepatotoxicity* sehingga inhibitor –glukosidase yang tidak memiliki efek tersebut masih di cari, terutama yang tidak menyebabkan *hepatotoxicity*. Gambar 2.19 merupakan struktur akarbosa dan voglibosa.



Gambar 2.19 Struktur inhibitor –glukosidase sintetik (Andrade *et al.*, 1998)

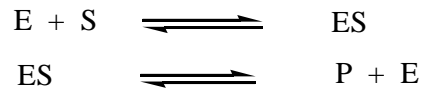
Sisi katalitik enzim MGAM dan SI telah dipelajari oleh Nakamura dengan menggunakan katalanol sebagai inhibitorynya. Gambar 2.20 merupakan perbandingan dari empat sisi katalitik  $\alpha$ -glukosidase. Warna merah pada gambar menunjukkan NtMGAM, hijau NtSI, ungu CtMGAM, dan biru CtSI (Nakamura *et al.*, 2012).



Gambar 2.20 Residu katalitik MGAM dan SI (Nakamura *et al.*, 2012)

## 2.5 Kinetika Penghambatan Enzim

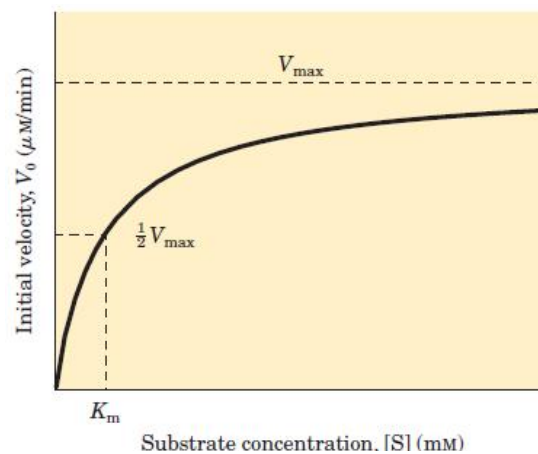
Dasar dari semua aspek kinetika penghambatan enzim adalah persamaan Michaelis-Menten. Persamaan ini diturunkan oleh Leonor Michaelis dan Maud Menten pada tahun 1913 yang berawal dari hipotesis dasar bahwa tahap penguraian kompleks enzim-substrat (ES) merupakan pembatas kecepatan reaksi enzimatik. Mereka mengemukakan bahwa reaksi enzimatik berlangsung melalui dua tahapan utama. Pertama, enzim membentuk kompleks dengan substrat (ES) dalam reaksi dapat balik yang berlangsung relatif cepat. Kedua, kompleks ES yang telah terbentuk mengalami penguraian dalam reaksi yang dapat balik menghasilkan produk reaksi (P) dan enzim bebas (E). Tahap ini berlangsung relatif lambat sehingga menjadi penentu kecepatan reaksi (Lehninger, 1988). Persamaan reaksi enzimatik yang dikemukakan oleh Michaelis-Menten adalah sebagai berikut:



Hubungan antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatik ditunjukkan oleh Gambar 2.21. Bentuk gambar tersebut diturunkan dari persamaan Michaelis-Menten yang dinyatakan secara matematis sebagai berikut:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Persamaan 2.1})$$

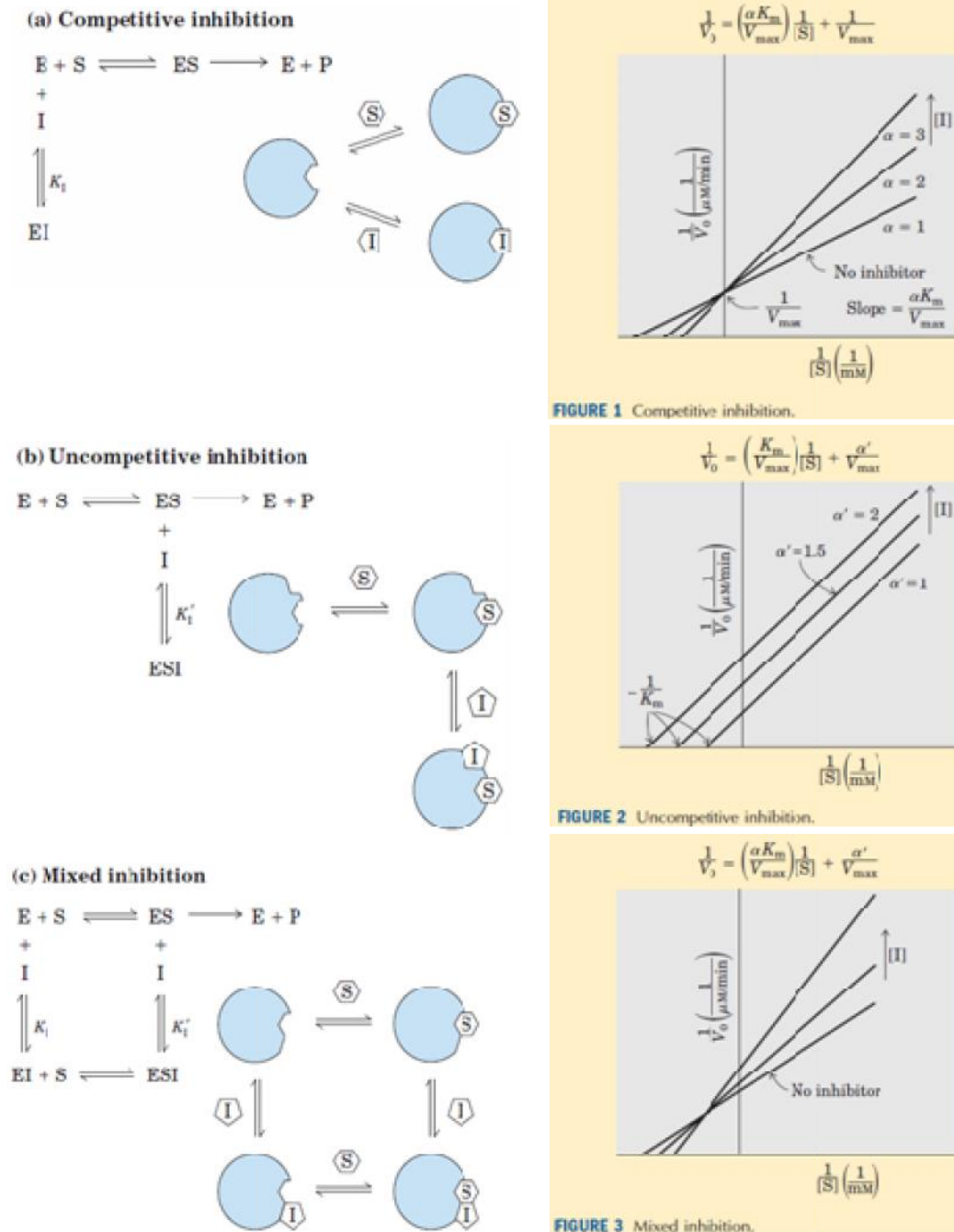
Dimana  $v_0$  = kecepatan awal reaksi,  $V_{\max}$  = kecepatan maksimum, dan  $K_M$  = konstanta Michaelis-Menten enzim bagi substrat tertentu.



Gambar 2.21 Kurva pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi

Persamaan Michaelis-Menten di atas dapat ditransformasikan secara aljabar menjadi bentuk lain yang lebih bermanfaat dalam menganalisis penghambatan enzim. Transformasi yang umum dilakukan dengan cara membalik persamaan di kiri dan kanan ruas sehingga menghasilkan persamaan baru yang disebut persamaan Lineweaver-Burk. Penghambatan enzim dapat terjadi secara reversibel atau irreversibel bergantung pada kekuatan ikatan yang dibentuk antara enzim dan inhibitorynya. Penghambatan reversibel dibagi menjadi tiga tipe yaitu kompetitif, unkompetitif, dan campuran (nonkompetitif) (Nelson & Cox, 2004). Gambar 2.22

menunjukkan tiga tipe penghambatan reversibel enzim yang dilengkapi dengan bentuk kurva Lineweaver-Burk dan persamaan matematisnya.



Gambar 2.22 Tiga tipe penghambatan enzim secara reversibel (Nelson & Cox, 2004)

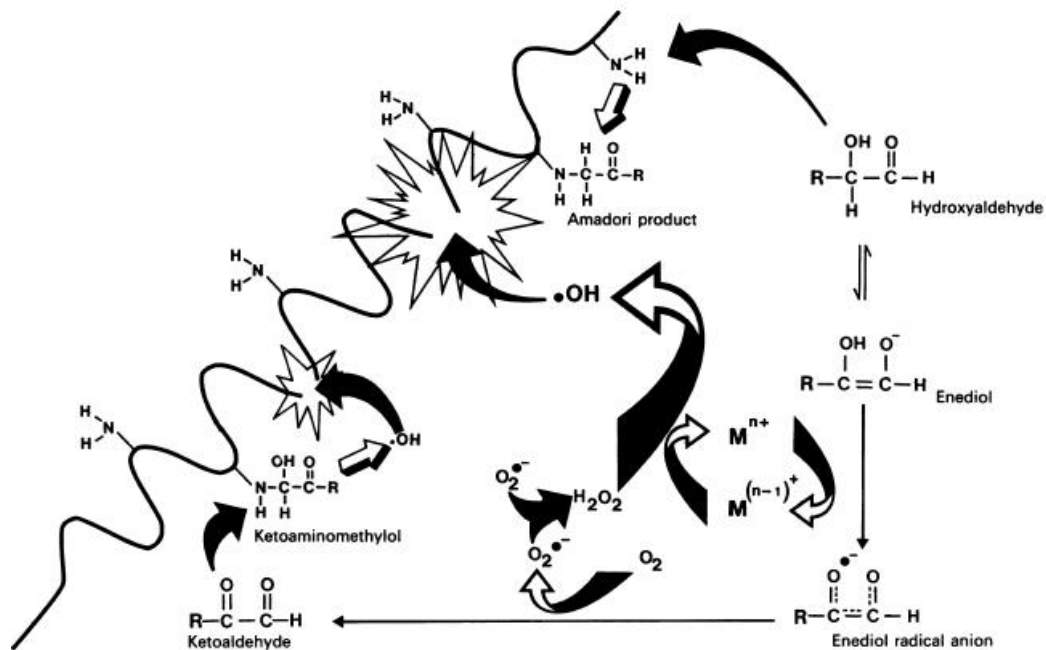
Tipe penghambatan kompetitif terjadi ketika inhibitor berkompetisi dengan substrat untuk mendapatkan sisi aktif enzim. Enzim tidak dapat menghasilkan produk ketika kompleks enzim-inhibitor (EI) terbentuk. Tipe penghambatan ini dapat disiasati dengan meningkatkan konsentrasi substratnya. Inhibitor unkompetitif membentuk kompleks dengan enzim pada sisi yang berbeda dari tempat substrat terikat. Inhibitor tipe ini dapat mengompleks dengan enzim setelah enzim mengompleks dengan substratnya. Kompleks yang dapat dibentuk dari tipe penghambatan ini adalah enzim-substrat-inhibitor (ESI). Tipe penghambatan kompetitif dan unkompetitif dapat bergabung menghasilkan tipe penghambatan nonkompetitif. Inhibitor nonkompetitif dapat berikatan dengan enzim di sisi aktif tempat substrat terikat (kompetitif) maupun sisi lain dari enzim yang bukan tempat substrat terikat (unkompetitif).

## **2.6 Radikal bebas dan Antioksidan**

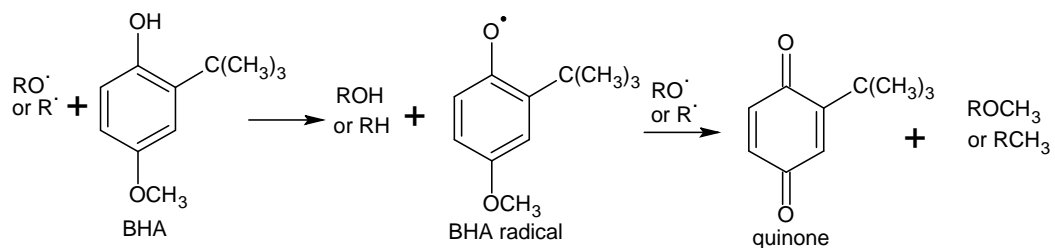
Hiperglikemia pada penderita DM menyebabkan produksi radikal bebas lebih tinggi dari orang normal. Radikal bebas dihasilkan melalui reaksi autooksidasi glukosa. Menurut Wolff (1992), glukosa dapat mengalami reaksi autooksidasi yang dikatalis oleh logam transisi dan menghasilkan senyawa oksigen reaktif. Menurut Guigliano (1996), produk reaksi autooksidasi glukosa adalah radikal anion superoksida ( $O_2^-$ ), radikal hidroksil ( $\cdot OH$ ), dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Mekanisme reaksi autooksidasi glukosa yang menginduksi kerusakan protein ditampilkan oleh Gambar 2.23.

Antioksidan dapat meredam radikal bebas sehingga bahaya yang ditimbulkannya menjadi minimum. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul yang kecil tetapi memiliki keistimewaan dalam menginaktivasi perkembangan reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal baru. Menurut Winarsi (2007), antioksidan bekerja melalui 3 mekanisme. Pertama antioksidan akan mencegah pembentukan radikal bebas baru. Kedua, antioksidan menginaktivasi radikal yang telah terbentuk

(pemutusan rantai reaksi). Ketiga, antioksidan akan memperbaiki kerusakan akibat radikal bebas. Gambar 2.24 merupakan mekanisme antioksidan sintetik (BHA) dalam meredam radikal bebas.



Gambar 2.23 Mekanisme reaksi autooksidasi glukosa (Hunt *et al.*, 1988)



Gambar 2.24 Reaksi BHA dan radikal bebas (Wade, 2006)

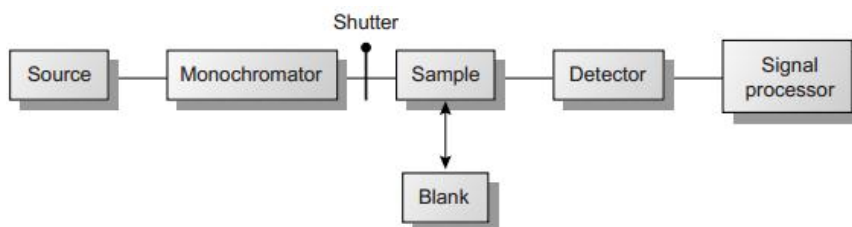
Senyawa metabolit sekunder tanaman merupakan sumber alami antidiabetik dan antioksidan yang sudah banyak diteliti. Berbagai metode telah dikembangkan untuk menganalisis potensi ekstrak tanaman sebagai antidiabetik dan antioksidan. Spektrofotometri merupakan salah satunya yang umum digunakan.

## 2.7 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi yang menggunakan monokromator sebagai selektor panjang gelombangnya. Instrumen spektrofotometer yang paling sederhana memiliki *single beam* (Gambar 2.25). Penentuan konsentrasi analit dengan spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada absorpsi radiasi ultraviolet atau visibel oleh salah satu analit. Persamaan Lambert-Beer digunakan untuk mengkonversi absorbansi ke konsentrasi (Harvey, 2000). Berikut adalah persamaan Lambert-Beer:

$$A = \epsilon bC \quad (\text{Persamaan 2.2})$$

Dimana  $A$  adalah absorbansi analit,  $\epsilon$  absorptivitas molar ( $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ),  $b$  adalah ketebalan kuvet, dan  $C$  adalah konsentrasi dalam molaritas.

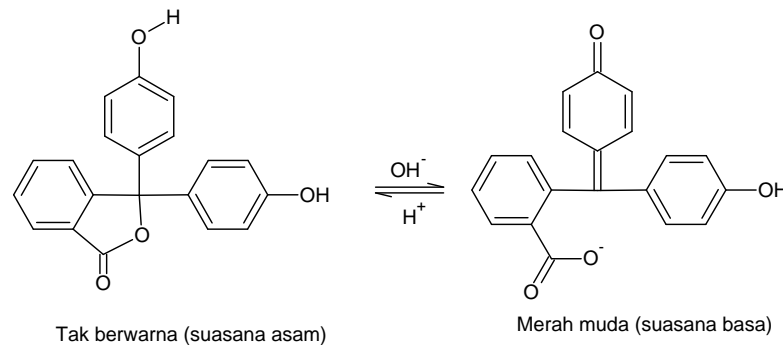


Gambar 2.25 Skema instrument spektrofotometer *single beam* (Harvey, 2000)

Hukum Lambert-Beer memiliki tiga keterbatasan utama yang meliputi keterbatasan hukum dasarnya sendiri, keterbatasan kimia, dan instrumentasinya. Keterbatasan hukum dasarnya sendiri muncul karena persamaan di atas hanya valid untuk konsentrasi rendah. Pada konsentrasi yang lebih tinggi partikel-partikel analit saling mempengaruhi satu dengan yang lain. Hasil interaksi antar partikel analit tersebut mengubah nilai  $\epsilon$  dan  $A$  karena mereka dipengaruhi oleh indeks bias dan indeks bias dipengaruhi konsentrasi. Konsentrasi yang dianjurkan di bawah  $10^{-3}$  M. Keterbatasan kimia dapat terjadi ketika senyawa yang mengabsorb radiasi dapat membentuk kesetimbangan pada kondisi pengukuran yang berbeda. Senyawa fenolik secara umum strukturnya dipengaruhi oleh pH, seperti fenolftalein. Pada pH basa



fenolftalein berwarna merah muda dan berubah menjadi transparan (tak berwarna) dalam suasana asam (Gambar 2.26). Sedangkan keterbatasan instrumental disebabkan oleh dua hal. Ketidakmonokromatisasi sinar dan adanya radiasi yang mencapai detektor tanpa melewati jalur optik yang seharusnya (Harvey, 2000).



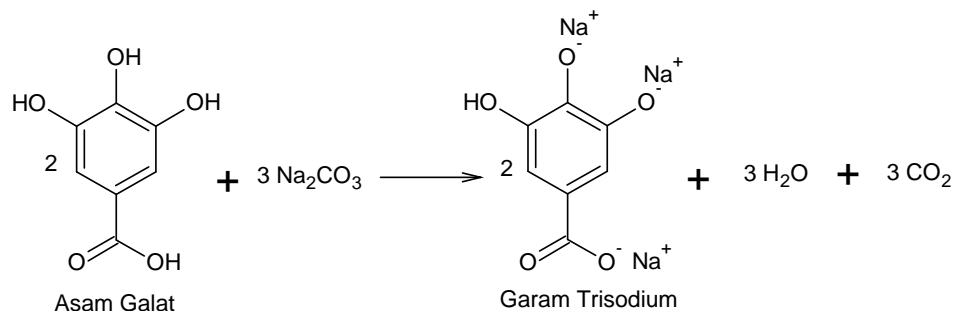
Gambar 2.26 Keseimbangan fenolftalein oleh pengaruh pH

Analisis peredaman radikal bebas dan penghambatan enzim dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofometer UV-Vis. Radikal bebas yang dianalisis seperti *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil* (DPPH), anion superoksida, dan hidroksil direaksikan dengan senyawa tertentu sehingga menghasilkan warna. Produk reaksi hidrolisis  $\alpha$ -amilase dan  $\beta$ -glukosidase juga direaksikan dengan pereaksi tertentu sehingga menghasilkan warna.

## 2.8 Prinsip Analisis Antidiabetik dan Antioksidan

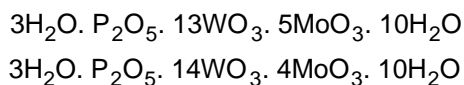
### 2.8.1 Analisis Total Fenolik

Satuan dasar yang digunakan dalam analisis potensi senyawa fenolik sebagai antidiabetik dan antioksidan adalah total fenoliknya. Asam galat yang digunakan sebagai standar senyawa fenolik akan bereaksi dengan natrium karbonat menghasilkan ion fenolat. Menurut Rayner & Raynel (2011), ion fenolat dari asam galat adalah garam *trisodium*. Persamaan reaksi kimia yang mungkin terjadi ditampilkan oleh Gambar 2.27.



Gambar 2.27 Reaksi pembentukan ion fenolat dari asam galat (Rayner & Raynel, 2011)

Reagen Folin-Ciocalteu yang berwarna kuning merupakan campuran fosfomolibdat dan fosfotungstat dengan dua komposisi yang berbeda (Swamy *et al.*, 2014). Berikut adalah komposisi reagen Folin-Ciocalteu:



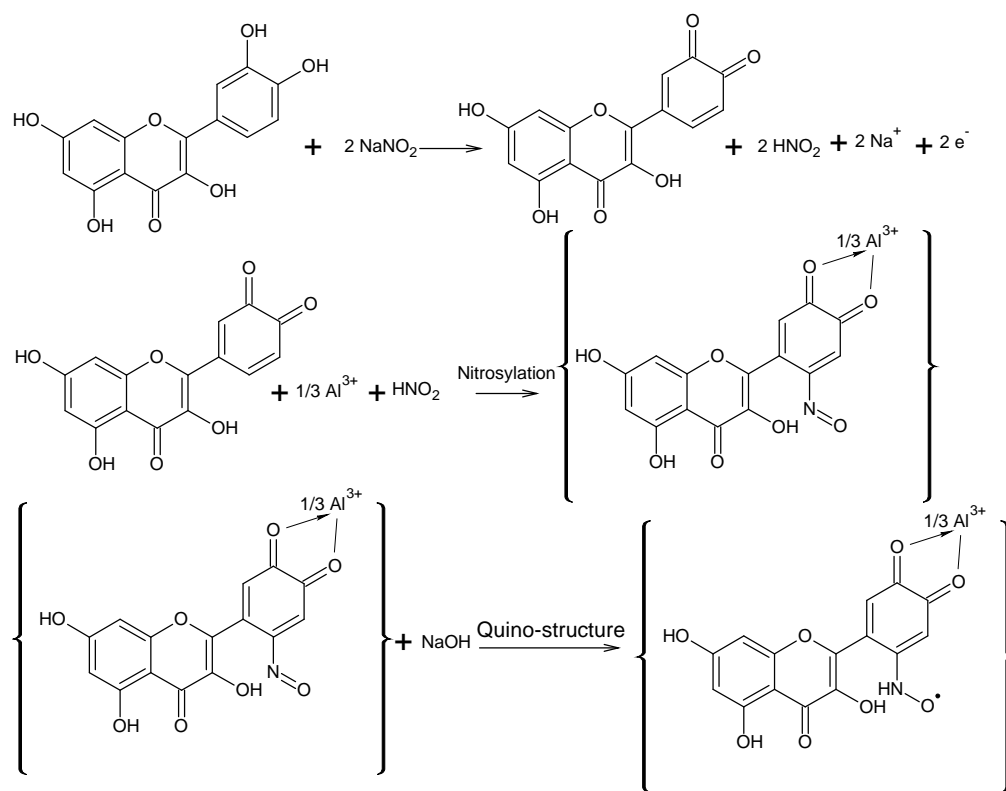
Ion fenolat yang telah terbentuk akan mereduksi satu atau lebih atom oksigen dari tungstat dan molibdat sehingga menghasilkan senyawa baru yang berwarna biru. Warna biru yang terbentuk memiliki panjang gelombang maksimum 750 nm.

### 2.8.2 Analisis Total flavonoid

Analisis total flavonoid dengan spektrofotometr UV-Vis dilakukan dengan menggunakan standar kuersetin. Prinsip analisis dengan metode ini didasarkan pada pembentukan kompleks antara gugus katekol dengan logam Aluminium yang menghasilkan warna. Kuersetin merupakan salah satu jenis flavonoid yang memiliki gugus katekol (1,2-dihidroksibenzena) sehingga dapat digunakan sebagai standar.

Gugus katekol kuersetin pada cincin B akan dioksidasi menjadi keton oleh natrium nitrit. Sementara natrium nitrit sendiri tereduksi menjadi asam nitrit. Kepekatan warna kuning dalam larutan akan meningkat ketika keton terbentuk. Gugus keton yang telah terbentuk akan mengompleks dengan kation aluminium ( $\text{Al}^{3+}$ ) yang berasal dari  $\text{AlCl}_3$  dan dilanjutkan dengan nitrosilasi oleh asam nitrit.

Senyawa tersebut kemudian direduksi oleh natrium hidroksida yang menghasilkan struktur quino (Zhu *et al.*, 2009). Gambar 2.28 merupakan mekanisme pembentukan kompleks kuersetin dengan alumunium dalam analisis total flavonoid. Tiga senyawa kuersetin akan mengompleks dengan satu logam alumunium membentuk struktur quino yang berwarna kuning. Warna kompleks quino dari kuersetin memiliki panjang gelombang maksimum pada 415 nm.

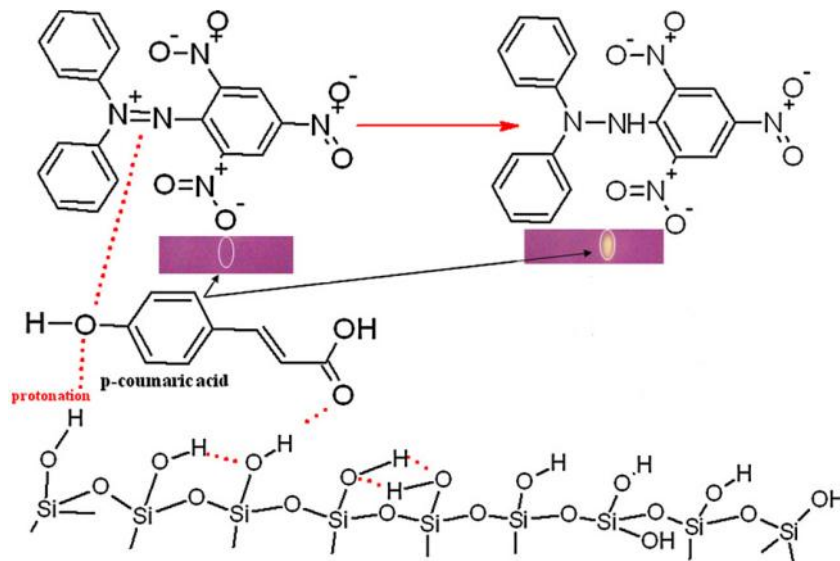


Gambar 2.28 Reaksi pembentukan warna dari kuersetin (Zhu *et al.*, 2009)

### 2.8.3 Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan *Dot-Blot*

Analisis KLT bertujuan untuk mengetahui komposisi ekstrak secara kualitatif. Prinsip pemisahan dengan metode KLT didasarkan pada perbedaan distribusi senyawa fenolik dalam campuran dengan fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan adalah silika gel. Silika gel memiliki gugus hidroksil yang dapat

membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa fenolik. Identifikasi kebenaran senyawa fenolik yang telah terpisah menggunakan visualisator DPPH. Senyawa fenolik dapat bereaksi dengan radikal DPPH dan menghasilkan perubahan warna. Gambar 2.29 adalah mekanisme pembentukan ikatan hidrogen antara asam p-kumarat dengan silika yang dilengkapi dengan reaksinya.



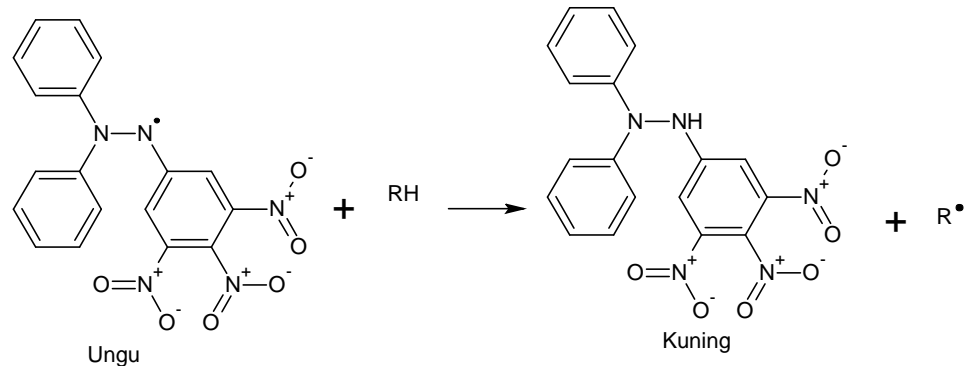
Gambar 2.29 Interaksi asam p-kumarat dengan silika gel dan DPPH (Ciesla *et al.*, 2012)

Perubahan warna dari ungu ke kuning pucat berbanding lurus dengan konsentrasi dan reaktivitas senyawa fenolik. Fenomena ini dapat digunakan untuk analisis antioksidan secara semikuantitatif dengan *dot-blot*. Analisis *dot-blot* atau titik dilakukan dengan menotolkan sampel dengan konsentrasi yang sama pada plat silika. Kekuatan senyawa fenolik dalam mereduksi reagen DPPH dilihat dari perubahan warnanya. Kancheva *et al.* (2010) menggunakan DPPH dengan konsentrasi 0,03 % sebagai visualisator pada analisis *dot-blot*.

#### 2.8.4 Analisis Peredaman Radikal DPPH

Peredaman radikal DPPH dianalisis secara spektrofotometri pada panjang gelombang maksimumnya. Menurut Soler-Rivas *et al.* (2000), panjang gelombang

maksimum radikal DPPH dalam metanol adalah 515 nm. Senyawa fenolik akan mereduksi radikal DPPH menjadi *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine* (DPPH-H) yang berwarna kuning. Gambar 2.30 menunjukkan reaksi antara radikal DPPH dengan antioksidan.



Gambar 2.30 Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan (Ciesla *et al.*, 2015)

Konsentrasi dan kereaktifan senyawa fenolik sangat menentukan reaksinya dengan DPPH. Konsentrasi maupun kereaktifan senyawa fenolik yang lebih tinggi akan mereduksi radikal DPPH yang lebih banyak, sehingga penurunan absorbansi pada 515 nm lebih besar. Fenomena ini yang dimanfaatkan untuk menentukan persen peredaman radikal DPPH pada berbagai konsentrasi sehingga dapat ditentukan nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan konsentrasi senyawa fenolik yang dibutuhkan untuk menurunkan 50% aktivitas radikal bebas. Menurut Hyun *et al.* (2013), persamaan berikut dapat digunakan untuk menentukan persen peredaman radikal DPPH dan hidroksil.

$$\text{Persen peredaman radikal} = \left[ \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100\% \quad (\text{Persamaan 2.3})$$

Dimana  $A_0$  adalah absorbansi kontrol dan  $A_1$  adalah absorbansi sampel. Kontrol merupakan larutan yang tidak ditambahkan sampel.

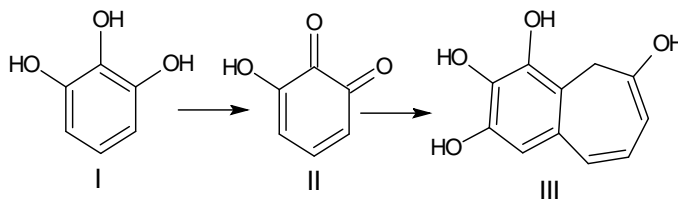
Nilai  $IC_{50}$  radikal DPPH dihitung melalui persamaan linear yang dihasilkan melalui pengeplotan antara % peredaman dan log konsentrasinya. Secara matematis persamaan untuk mendapatkan nilai  $IC_{50}$  adalah sebagai berikut:

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b} \quad (\text{Persamaan 2.4})$$

Nilai a dan b diperoleh dari persamaan linear  $y = bx + a$ .

### 2.8.5 Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida

Analisis peredaman radikal anion superoksida secara spektrofotometri didasarkan pada reaksi autooksidasi pirogallol. Pirogallol yang tidak berwarna akan berubah menjadi orange ketika teroksidasi. Menurut Tauber (1953), reaksi autooksidasi pirogallol yang menghasilkan warna orange ditunjukkan oleh Gambar 2.31.



Gambar 2.31 Reaksi autooksidasi pirogallol (Tauber, 1953)

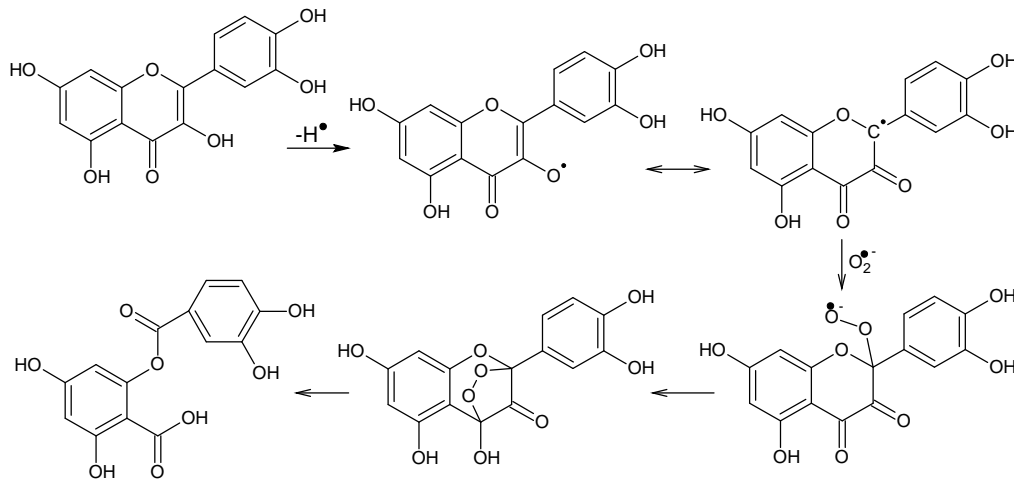
Pirogallol (I) merupakan senyawa yang tidak berwarna. Pada kondisi basa senyawa tersebut mengalami autooksidasi yang menghasilkan radikal superoksida dan ortoquinon (II). Ortoquinon yang telah terbentuk akan dioksidasi lebih lanjut oleh radikal anion superoksida menjadi purpurogalin (III) yang memiliki panjang gelombang maksimum 320 nm. Reaksi autooksidasi ini akan terus berlangsung sampai pirogallol dan ortoquinon habis bereaksi. *Slope* reaksi autooksidasi pirogallol menunjukkan laju pembentukan purpurogalin. Laju pembentukan purpurogalin berbanding lurus dengan konsentrasi radikal anion superoksida karena radikal anion superoksida yang mengoksidasi ortoquinon menjadi purpurogalin. Keberadaan

antioksidan akan menurunkan laju pembentukan purpurogalin karena radikal anion superoksida bereaksi dengan antioksidan tersebut sehingga nilai *slope* menjadi turun. Menurut Li *et al.* (2012), nilai persen peredaman radikal anion superoksida dapat dihitung melalui persamaan berikut:

$$\text{Persen peredaman radikal} = \left[ \frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100\% \quad (\text{Persamaan 2.5})$$

Dimana  $A_0$  adalah *slope* kontrol dan  $A_1$  adalah *slope* sampel. Kontrol merupakan larutan yang tidak ditambahkan sampel.

Radikal anion superoksida yang dihasilkan selama reaksi autooksidasi pirogallol akan bereaksi dengan antioksidan seperti fenolik. Mekanisme reaksi senyawa fenolik dalam meredam radikal anion superoksida mungkin bermacam-macam. Gambar 2.32 merupakan salah satu kemungkinan reaksi kuersetin dengan radikal anion superoksida.

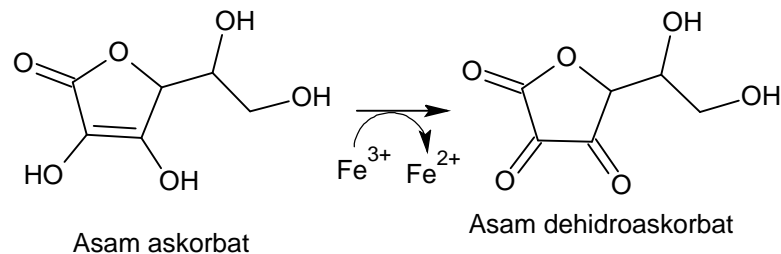


Gambar 2.32 Mekanisme reaksi peredaman radikal anion superoksida oleh kuersetin (Nimse & Pal, 2015)

### 2.8.6 Analisis Peredaman Radikal Hidroksil

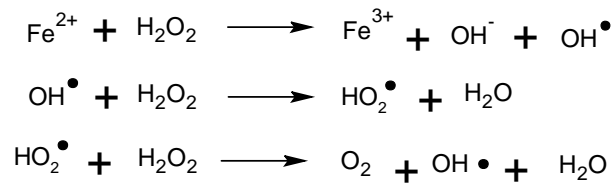
Radikal hidroksil dihasilkan melalui reaksi Fenton pada sistem yang terdiri atas Fe<sup>3+</sup>-asam askorbat-EDTA-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gutttridge dan Halliwell, 1988). Ion Fe<sup>3+</sup> yang

mengompleks dengan EDTA akan direduksi oleh asam askorbat menjadi ion  $\text{Fe}^{2+}$ . Gambar 2.36 merupakan reaksi reduksi ion  $\text{Fe}^{3+}$  oleh asam askorbat.



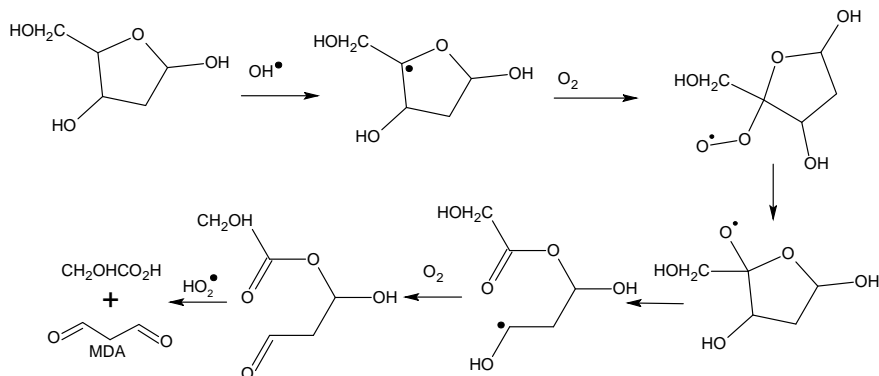
Gambar 2.33 Reaksi reduksi ion  $\text{Fe}^{3+}$  oleh asam askorbat

Ion  $\text{Fe}^{2+}$  yang telah terbentuk akan dioksidasi oleh  $\text{H}_2\text{O}_2$  melalui reaksi Fenton sehingga menghasilkan radikal hidroksil. Berikut adalah reaksi Fenton yang menghasilkan radikal hidroksil.

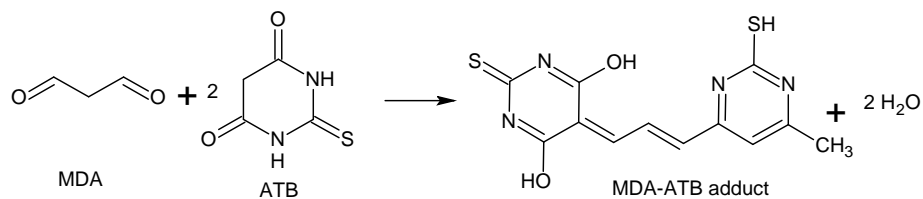


Radikal hidroksil yang telah terbentuk akan menyerang 2-deoksi-D-ribosa yang menghasilkan produk campuran. Gambar 2.34 merupakan reaksi antara radikal hidroksil dengan 2-deoksi-D-ribosa. Malondialdehida (MDA) merupakan salah satu produknya yang bereaksi dengan asam 2-tiobarbiturat (ATB) membentuk MDA-ATB *adduct*. Senyawa MDA-ATB *adduct* memiliki warna pink yang panjang gelombang maksimumnya 532 nm. Reaksi pembentukan MDA-ATB *adduct* ditampilkan oleh Gambar 2.35.



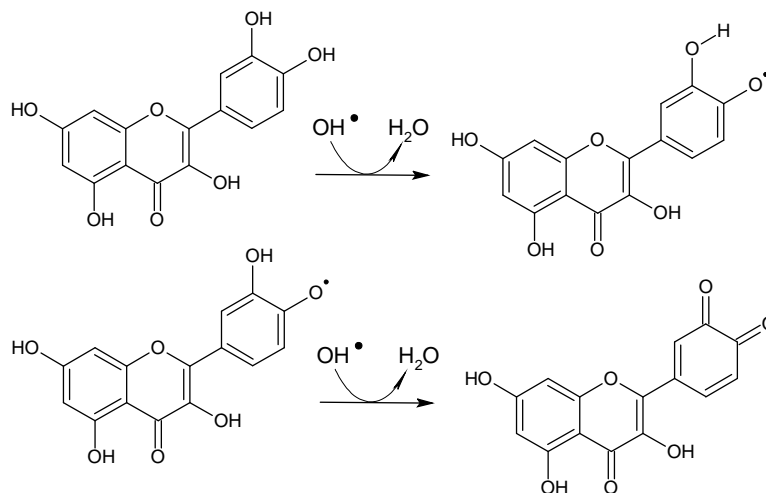


Gambar 2.34 Reaksi radikal hidroksil dengan 2-deoksi-D-ribosa



Gambar 2.35 Reaksi pembentukan MDA-ATB *adduct* yang berwarna pink

Senyawa flavonoid mampu meredam radikal hidroksil dengan berbagai cara. Menurut Bubols *et al.* (2013) mekanisme peredaman radikal hidroksil oleh kuersetin ditunjukkan oleh Gambar 2.36.

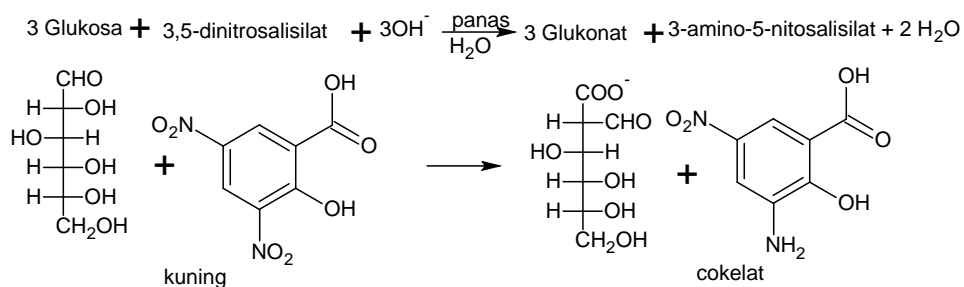


Gambar 2.36 Mekanisme reaksi peredaman radikal hidroksil oleh kuersetin (Bubols *et al.*, 2013)

### 2.8.7 Analisis Penghambatan $\alpha$ -Amilase

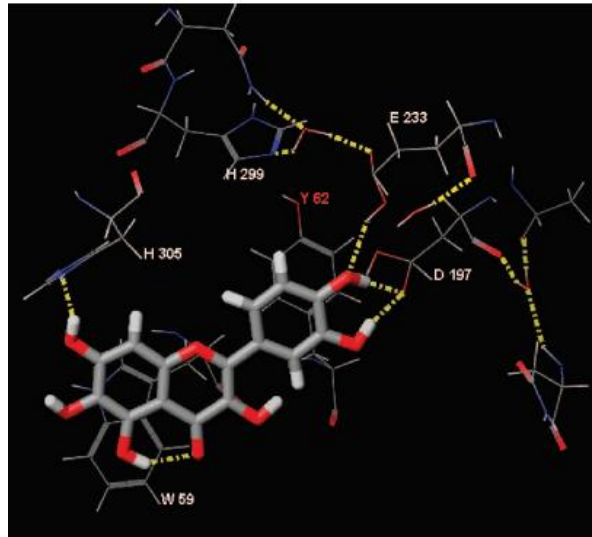
Pati terlarut akan dihidrolisis oleh  $\alpha$ -amilase menjadi oligosakarida yang lebih pendek melalui pemutusan ikatan  $\alpha$ -D-(1-4) glikosida. Produk akhir reaksi hidrolisis  $\alpha$ -amilase masih campuran oligosakarida seperti maltosa, maltotriosa, dan oligosakarida bercabang dengan 6-8 unit glukosa yang mengandung baik ikatan  $\alpha$ -1,4 maupun  $\alpha$ -1,6 (Sales *et al.*, 2012).

Reaksi hidrolisis  $\alpha$ -amilase dapat dihentikan dengan pemanasan. Pemanasan menyebabkan perubahan konfigurasi dari  $\alpha$ -amilase sehingga aktivitasnya hilang. Produk reaksi hidrolisis setelah dihentikan reaksinya ditentukan konsentrasinya dengan menggunakan reagen pewarna asam dinitrosalisilat (DNS). Reagen DNS akan direduksi setiap gula reduksi yang terdapat dalam larutan sehingga produk campuran tersebut dapat ditentukan konsentrasinya. Senyawa 3-amino-5-nitrosalisilat yang dihasilkan dari reaksi tersebut memiliki warna orange gelap dengan panjang gelombang maksimum 540 nm. Gambar 2.37 merupakan reaksi reduksi DNS oleh salah satu gula reduksi yaitu glukosa.



Gambar 2.37 Reaksi reduksi DNS dengan gula pereduksi (Timerman, Tanpa Tahun)

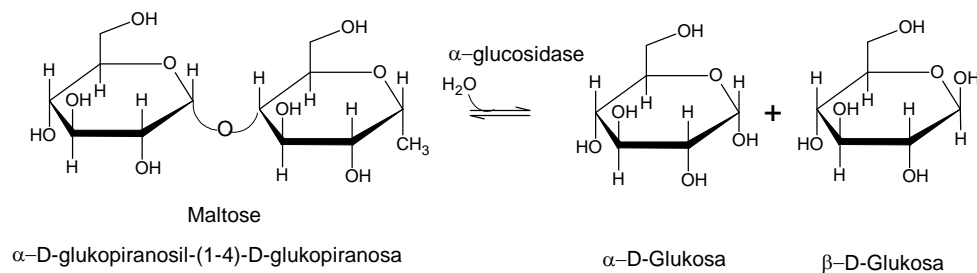
Senyawa fenolik seperti kuersetagetin mampu menghambat aktivitas  $\alpha$ -amilase. Menurut Piparo *et al.* (2008), cincin B dari kuersetagetin dapat berikatan secara kovalen dengan residu katalitik Asp<sup>197</sup>. Gambar 2.38 merupakan bentuk interaksi kuersetagetin dengan  $\alpha$ -amilase. Terbentuknya ikatan antara kuersetagetin dengan  $\alpha$ -amilase menyebabkan substrat tidak dapat terikat sehingga produk tidak dapat terbentuk.



Gambar 2.38 Interaksi kuersetagenin dengan  $\alpha$ -amilase (Piparo *et al.*, 2008)

### 2.8.8 Analisis Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase

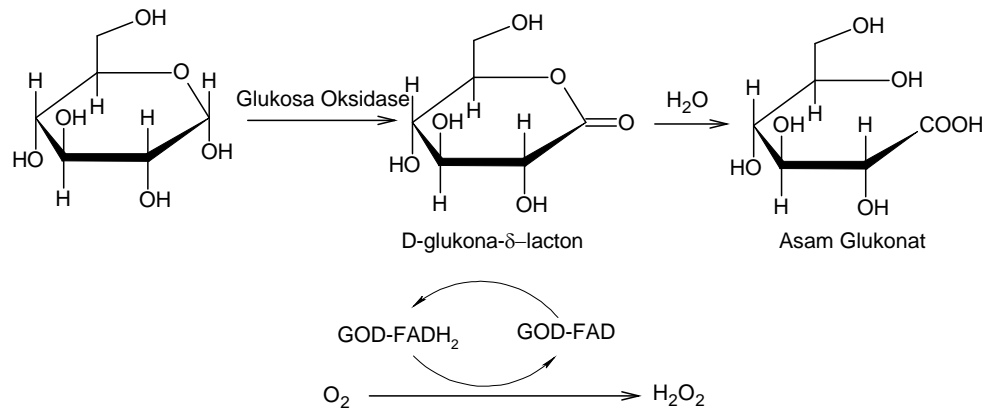
Analisis penghambatan  $\alpha$ -glukosidase didasarkan pada penurunan produk reaksi (glukosa) ketika ditambahkan inhibitor. Miyazawa *et al.* (2005), menggunakan maltosa sebagai substrat  $\alpha$ -glukosidase.  $\alpha$ -glukosidase akan menghidrolisis maltosa menjadi dua unit glukosa (Gambar 2.39).



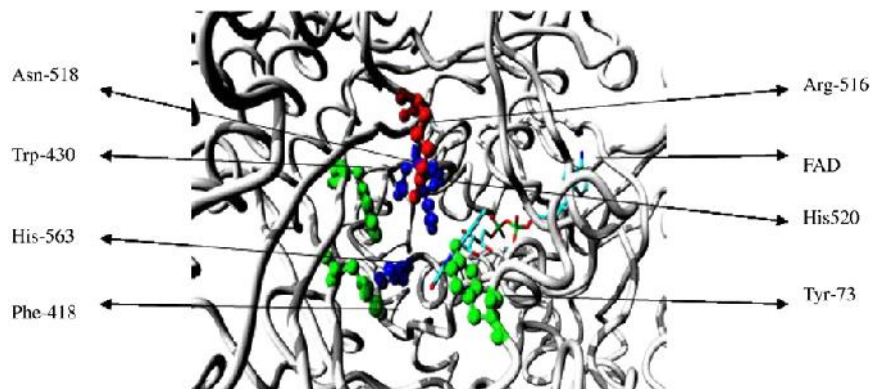
Gambar 2.39 Reaksi hidrolisis maltosa oleh  $\alpha$ -glukosidase

Glukosa yang telah dilepaskan dari reaksi di atas dapat ditentukan konsentrasinya dengan metode spektrofotometri. Pertama, glukosa direaksikan dengan glukosa oksidase untuk menghasilkan asam glukonat dan hidrogen peroksida (Gambar 2.40). Glukosa oksidase merupakan enzim flavoprotein dengan oksigen

sebagai akseptor elektronnya. FAD yang merupakan kofaktornya akan direduksi menjadi  $\text{FADH}_2$  selama reaksi oksidasi glukosa berlangsung. Sisi katalitik glukosa oksidase dari *Penicillium amagasakiense* diketahui berupa Tyr<sup>73</sup>, Phe<sup>418</sup>, Trp<sup>430</sup>, Arg<sup>516</sup>, Asn<sup>518</sup>, His<sup>520</sup> dan His<sup>563</sup> (Bankar *et al.*, 2009) (Gambar 2.41).



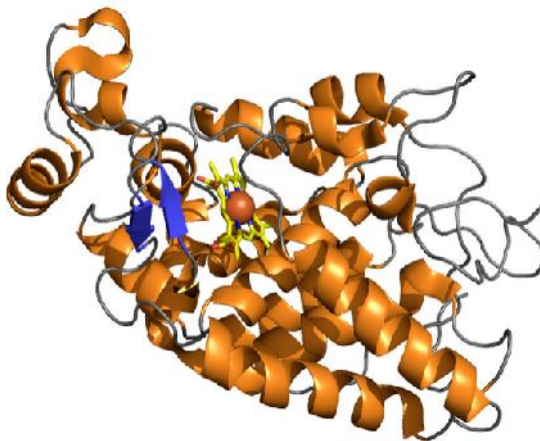
Gambar 2.40 Reaksi oksidasi glukosa oleh glukosa oksidase (Bankar *et al.*, 2009)



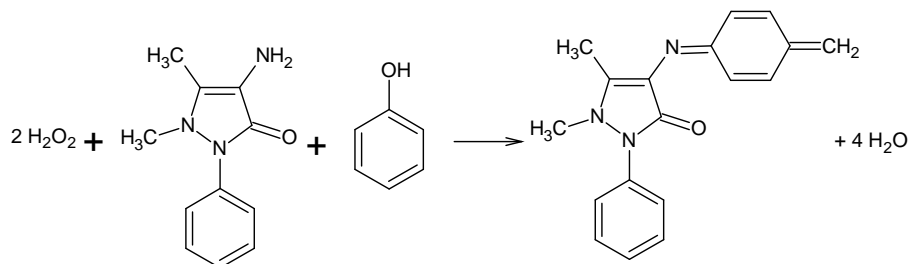
Gambar 2.41 Sisi katalitik enzim glukosa oksidase dari *Penicillium amagasakiense* (Bankar *et al.*, 2009)

Hydrogen peroksida yang telah dihasilkan dari reaksi diatas direaksikan dengan 4-aminoantipirin ( $\text{AmNH}_2$ ), fenol ( $\text{PhOH}$ ), dan *horseradish peroxidase* (HRP) untuk menghasilkan warna (Vinodu & Padmanabhan, 2001). *Horseradish peroxidase* (HRP) memiliki kation  $\text{Fe}^{2+}$  dipusatnya sehingga disebut *haem* (Gambar 2.42). Enzim ini memiliki residu katalitik His<sup>42</sup> yang mengoksidasi substratnya sebagaimana

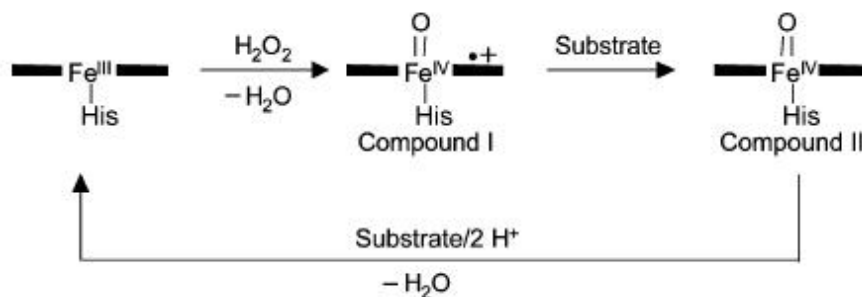
ditunjukkan oleh Gambar 2.43. Produk dari reaksi ini menghasilkan *quinoneimine* yang berwarna pink dan memiliki panjang gelombang maksimum 500 nm. Mekanisme reaksi katalisisnya ditunjukkan oleh Gambar 2.44.



Gambar 2.42 Struktur 3D *horseradish peroxidase* (Vinodu & Padmanabhan, 2001)



Gambar 2.43 Reaksi oksidasi hidrogen peroksida oleh *horseradish peroxidase* (Vinodu & Padmanabhan, 2001)



Gambar 2.44 Mekanisme katalisis substrat oleh *horseradish peroxidase* (Katherine *et al.*, 2003)

## BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2015 sampai Mei 2015 di CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) Universitas Jember.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian digolongkan menjadi peralatan gelas, instrumen, dan peralatan bukan gelas. Peralatan gelas meliputi Erlenmeyer 500 ml, gelas ukur 250 ml, tabung reaksi, labu ukur 5, 10 dan 100 ml. Peralatan instrumen meliputi blender, timbangan analitik, evaporator vakum, corong vakum, pendingin, pipet mikro, inkubator, satu set alat spektrofotometer UV-Vis, *shaker*, *96-well plates*, *microplate readers*, dan sentrifugator. Peralatan bukan gelas antara lain gunting, ayakan, plastik sampel, kertas label, kertas saring, *ependorf*, dan aluminium *foil*.

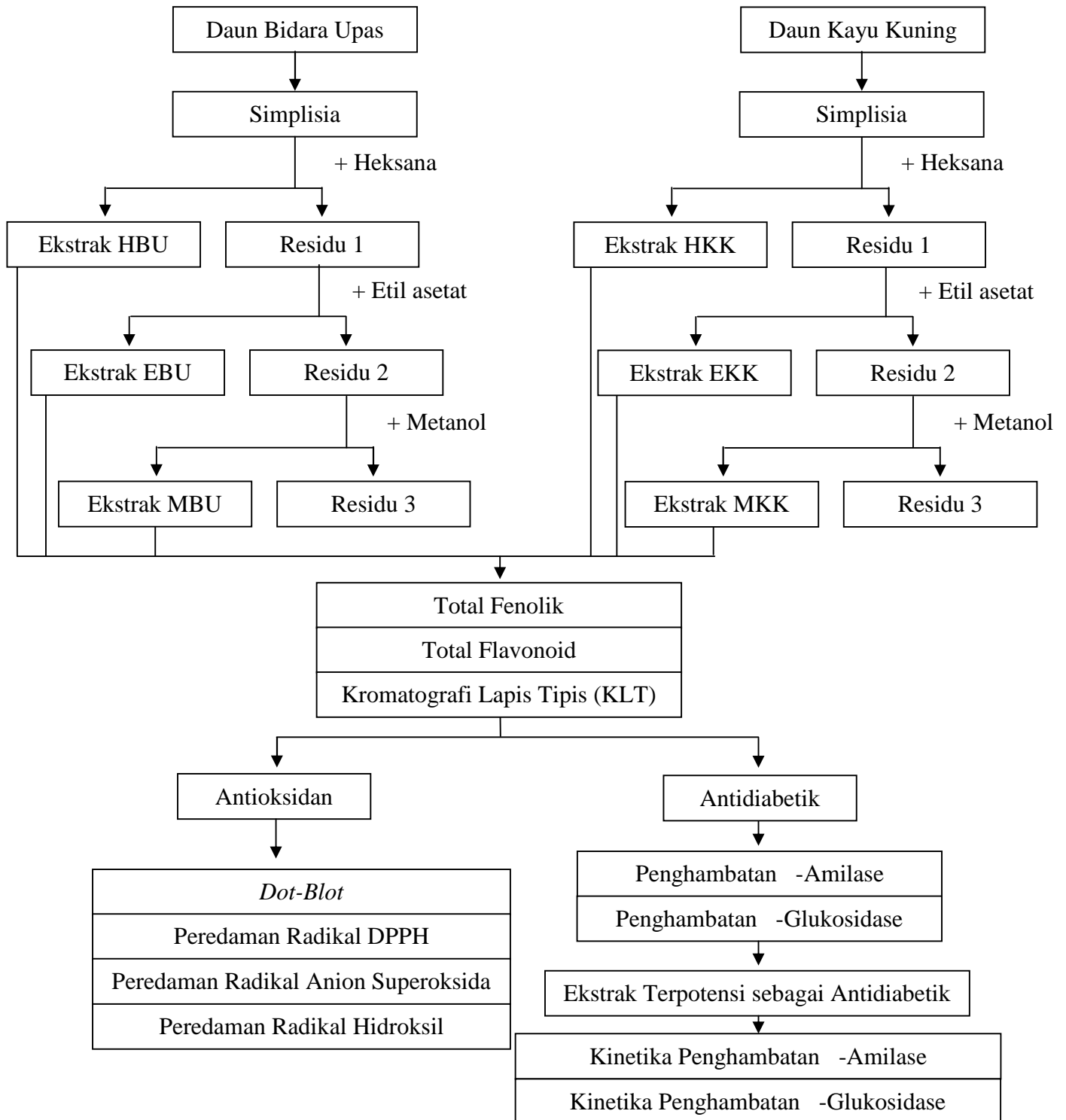
#### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: daun Bidara Upas (*Merremia mammosa*); daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava*); heksana (Merck); etil asetat (Merck); metanol (Merck); akuades; reagen Folin-Ciocalteu (Merck); natrium karbonat (Merck); asam galat (Sigma-Aldrich); natrium nitrit (Merck); aluminium(III) klorida (Merck); natrium hidroksida (Merck); kuersetin (nacalai tasque); asam format (Merck); *1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil* (DPPH) (nacalai tasque); etanol (Merck); vitamin C (nacalai tasque); *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) (nacalai tasque); besi(III) klorida (Merck); hidrogen peroksida (Sigma-Aldrich); 2-deoksi-D-ribosa (Sigma-Aldrich); kalium dihidrogenfosfat (Merck); asam trikloroasetat (ATC, Merck); asam 2-tiobarbiturat (ATB, Sigma-Aldrich); pirogalol (Sigma-Aldrich); trizma-base (nacalai tasque); asam klorida (Merck); sukrosa

(Merck); dimetilsulfoksida (DMSO) (Merck); natrium hidrogenfosfat (nacaletasque); *horseradish peroxidase* (Sigma-Aldrich); -glukosidase (Sigma-Aldrich); glukosa oksidase (Sigma-Aldrich); 4-aminoanipirin (Sigma-Aldrich); fenol (Sigma-Aldrich); natrium klorida (Merck); kalium natrium tartrat (Merck), pati terlarut (Merck), asam 3,5-dinitrosalisilat (Merck), -amilase (Sigma-Aldrich), kalium hidrogen fosfat (Merck), triton x-100 (Sigma-Aldrich), dan akarbosa (Glucobay).

### 3.3 Rancangan Penelitian

#### 3.3.1 Diagram Alir Penelitian





### 3.3.2 Prosedur Penelitian

#### a. Pembuatan Simplisia Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Daun Bidara upas dan Kayu kuning yang telah divalidasi oleh Lembaga Taman Nasional Meru Betiri dikeringkan selama 10 hari dalam ruangan pada suhu ruang. Simplisia yang telah kering disortir berdasarkan bentuk dan warnanya. Bagian-bagian daun yang berlubang dan berwarna coklat dipisahkan. Daun yang terpilih dipotong kecil-kecil untuk dihaluskan dengan blender. Simplisia yang telah halus diseragamkan ukurannya dengan ayakan 60 mesh. Partikel dengan ukuran diameter kurang dari 0,250 mm akan lolos ayakan sedangkan partikel yang diameternya diatas itu akan tertahan di ayakan.

#### b. Ekstraksi Fenolik dari Simplisia Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Ekstraksi bioaktif dari simplisia daun Bidara upas dan Kayu kuning dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan secara bertingkat dengan tiga jenis pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu heksana, etil asetat, dan metanol. Maserasi dimulai dari pelarut yang non polar, yaitu heksana. Sebanyak 50 gram simplisia daun Bidara upas dan Kayu kuning dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 ml yang berbeda. Pelarut heksana sebanyak 250 ml ditambahkan ke dalam masing-masing Erlenmeyer dan *dishaker* selama 72 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 150 *rotation per minutes* (RPM). Setelah itu difiltrasi dengan corong vakum sehingga dihasilkan filtrat dan residu 1. Filtrat dievaporasi dengan evaporator vakum pada suhu 40° C sehingga didapat ekstrak heksana Bidara upas (HBU) dan heksana Kayu kuning (HKK). Residu 1 dari Bidara upas dan Kayu kuning dibiarkan kering selama sehari semalam. Residu 1 dimasukkan lagi ke dalam Erlenmeyer 500 ml yang berbeda setelah kering dan 250 ml etil asetat ditambahkan ke dalam masing-masing Erlenmeyer. Campuran *dishaker* selama 72 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 150 RPM. Setelah itu difiltrasi dengan corong vakum sehingga dihasilkan filtrat dan residu 2. Filtrat dievaporasi dengan evaporator vakum pada suhu 40° C sehingga didapat ekstrak etil asetat Bidara upas (EBU) dan etil asetat Kayu kuning (EKK).

Residu 2 dari Bidara upas dan Kayu kuning dibiarkan kering selama sehari semalam. Residu 2 dimasukkan lagi ke dalam Erlenmeyer 500 ml yang berbeda setelah kering dan 250 ml metanol ditambahkan ke dalam masing-masing Erlenmeyer. Campuran *dishaker* selama 72 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 150 RPM. Setelah itu difiltrasi dengan corong vakum sehingga dihasilkan filtrat dan residu 3. Filtrat dievaporasi dengan evaporator vakum pada suhu 40° C sehingga didapat ekstrak metanol Bidara upas (MBU) dan metanol Kayu kuning (MKK). Ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK ditimbang untuk menghitung persen rendemennya. Persen rendemen masing-masing ekstrak dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Persen rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3.1})$$

Setelah dihitung nilai rendemennya masing-masing ekstrak dilarutkan dalam metanol dan disimpan dalam pendingin untuk analisis selanjutnya.

#### c. Analisis Total Fenolik Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Total fenolik ekstrak daun Bidara Upas dan Kayu kuning ditentukan dengan metode Taga *et al.* (1984) yang dihitung berdasarkan standar asam galat. Sebanyak 50 µl ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Sebanyak 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% (w/v) ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi dan diinkubasi selama 2 menit. Setelah itu 50 µl reagen Folin-Ciocalteu 50% (v/v) ditambahkan dan diinkubasi lagi selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Total fenolik masing-masing ekstrak ditentukan dalam mg asam galat *equivalent* (AGE) per gram ekstrak menggunakan persamaan dari kurva standar asam galat.

#### d. Analisis Total Flavonoid Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Total flavonoid ekstrak Bidara Upas dan Kayu kuning ditentukan dengan metode Chang *et al.* (2002) yang dihitung berdasarkan standar kuersetin. Sebanyak

150 µl ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Sebanyak 400 µl akuades ditambahkan kedalamnya. Larutan ini ditambahkan dengan 30 µl NaNO<sub>2</sub> 5% (w/v) dan diinkubasi selama 5 menit. Setelah itu 30 µl AlCl<sub>3</sub> 10% (w/v) ditambahkan dan diinkubasi lagi selama 6 menit. Sebanyak 200 µl NaOH 1 M dan 240 µl akuades ditambahkan setelah 6 menit inkubasi. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 415 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Total flavonoid masing-masing ekstrak ditentukan dalam mg kuersetin *equivalent* (KE) per gram ekstrak menggunakan persamaan dari kurva standar kuersetin.

e. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Analisis KLT ekstrak Bidara Upas dan Kayu kuning dilakukan dengan metode Wang *et al.* (2012). Sebanyak 0,25 µl ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK dengan konsentrasi 0,5 µg AGE/µl ditotolkan pada plat silika gel 60 F<sub>254</sub> sebanyak 14 kali. Jarak antar titik penotolan pada plat adalah 0,7 cm. Pelarut ekstrak setelah penotolan diuapkan dengan *hair drayer*. Plat silika hasil penotolan dimasukkan ke dalam *chamber* yang sudah dijenuhkan oleh fase geraknya yaitu campuran etil asetat-asam format-air (82:9:9, v/v/v). Fase gerak dibiarkan mengelusi ekstrak sampai 8 cm dari titik awal penotolan. Larutan DPPH 0,03% (dalam metanol) disemprotkan pada plat yang sudah dikeringkan untuk menghasilkan warna. Metanol yang merupakan pelarut ekstrak digunakan sebagai kontrol negatif. Dokumentasi dilakukan setelah 1 menit penyemprotan.

f. Analisis *Dot-Blot* Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Analisis *dot-blot* ekstrak Bidara Upas dan Kayu kuning dilakukan dengan metode Kancheva *et al.* (2010). Sebanyak 10 µl ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK dengan konsentrasi 50 µg AGE/ml ditotolkan pada plat silika gel 60 F<sub>254</sub>. Luas tiap-tiap titik penotolan pada plat adalah 2 cm<sup>2</sup> dengan posisi titik

penotolan berada pada pusatnya. Pelarut ekstrak setelah penotolan diuapkan dengan *hair drayer*. Vitamin C yang merupakan antioksidan yang sudah dipasarkan digunakan sebagai standar dan metanol kontrol negatifnya. Larutan DPPH 0,03% (dalam metanol) disemprotkan pada plat setelah dikeringkan untuk menghasilkan warna. Dokumentasi dilakukan setelah 1 menit penyemprotan.

g. Analisis Peredaman Radikal DPPH oleh Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Peredaman radikal DPPH oleh ekstrak Bidara Upas dan Kayu kuning dianalisis dengan metode Soler-Rivas *et al.* (2000). Sebanyak 200  $\mu$ l ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK dengan 5 konsentrasi yang berbeda pada masing-masing ekstrak dimasukkan ke dalam *96-well plates*. Setelah itu ditambahkan 100  $\mu$ l reagen DPPH 90  $\mu$ M (dalam metanol). Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan *microplate readers* pada 515 nm setelah 30 menit inkubasi. Dihitung persen peredaman radikal DPPH pada masing-masing konsentrasi ekstrak dengan persamaan 2.3 dan hasilnya digunakan untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  dengan persamaan 2.4. Standar yang digunakan adalah vitamin C.

h. Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida oleh Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Peredaman radikal anion superoksida oleh ekstrak Bidara Upas dan Kayu kuning dianalisis dengan metode Tang *et al.* (2010). Sebanyak 200  $\mu$ l ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK ditambahkan dengan 1,7 ml buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8,2) dalam tabung reaksi yang berbeda. Pirogalol 10 mM (dalam HCl 10 mM) sebanyak 100  $\mu$ l ditambahkan setelah 10 menit inkubasi. *Slope* reaksi autooksidasi pirogolol selama 4 menit reaksi ditentukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 320 nm. Persen peredaman radikal anion superoksida dihitung dengan persamaan 2.5. Standar yang digunakan adalah vitamin C.

i. Analisis Peredaman Radikal Hidroksil oleh Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Peredaman radikal hidroksil oleh ekstrak Bidara Upas dan Kayu kuning dianalisis dengan metode Halliwell *et al.* (1987). Larutan yang terdiri atas 50  $\mu$ l 2-deoksi-D-ribosa 28 mM (dalam buffer fosfat 20 mM; pH 7,4), 150  $\mu$ l ekstrak (HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK), 100  $\mu$ l EDTA 1 mM, 100  $\mu$ l FeCl<sub>3</sub> 10 mM, 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM, dan 50  $\mu$ l asam askorbat 1 mM dimasukkan dalam *ependorf* yang berbeda untuk ekstrak yang berbeda. Sebanyak 500  $\mu$ l ATB 1% dan 500  $\mu$ l ATC 2,8% ditambahkan ke dalam *ependorf* setelah diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37° C. Larutan divortex dan diinkubasi lagi selama 20 menit pada suhu 100° C untuk menghasilkan warna pink. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 532 nm setelah dingin. Persen peredaman radikal hidroksil dihitung dengan persamaan 2.3. Standar yang digunakan adalah vitamin C.

j. Analisis Penghambatan  $\alpha$ -Amilase oleh Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Penghambatan  $\alpha$ -amilase oleh ekstrak Bidara Upas dan Kayu kuning dianalisis dengan metode Hashim *et al.* (2013) yang dimodifikasi. Sebanyak 100  $\mu$ l ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK dimasukkan ke dalam masing-masing *ependorf* yang berbeda dengan label S<sup>+</sup> dan S<sup>-</sup>. Larutan DMSO 100  $\mu$ l juga dimasukkan ke dalam *ependorf* yang berlabel C<sup>+</sup> dan C<sup>-</sup> sebagai kontrolnya. *Eppendorf* yang berlabel S<sup>+</sup> dan C<sup>+</sup> ditambahkan 150  $\mu$ l  $\alpha$ -amilase (0,1 u/ml) sedangkan S<sup>-</sup> dan C<sup>-</sup> ditambahkan 150  $\mu$ l buffer fosfat pH 6,9. Larutan dipreinkubasi selama 15 menit pada suhu 37° C setelah divortex. Setelah itu ditambahkan 250  $\mu$ l pati telarut (1% w/v) ke dalam semua *ependorf*. Larutan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37° C setelah divortex. Reaksi hidrolisis dihentikan dengan mendidihkan selama 1 menit. Larutan diambil 160  $\mu$ L dari masing-masing *ependorf* untuk dimasukkan ke *ependorf* lain dengan label yang sama setelah dididihkan selama 15 menit setelah ditambahkan 80  $\mu$ l reagen DNS untuk menentukan

total gula reduksinya. Setelah itu diencerkan dengan 720  $\mu\text{l}$  akuades dan dipipet 200  $\mu\text{l}$  ke dalam 96-well plates untuk diukur absorbansinya dengan *microplate readers* pada panjang gelombang 540 nm. Akarbosa yang merupakan antidiabetik yang sudah dipasarkan digunakan sebagai standarnya. Persen penghambatan  $\alpha$ -amilase oleh masing-masing ekstrak dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Persen Penghambatan} = \left[ \frac{(C^+ - C^-) - (S^+ - S^-)}{(C^+ - C^-)} \right] \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3.2})$$

Dimana  $C^+$  adalah kontrol sampel dengan enzim dan  $C^-$  adalah kontrol sampel tanpa enzim. Sedangkan  $S^+$  adalah sampel dengan enzim dan  $S^-$  adalah sampel tanpa enzim.

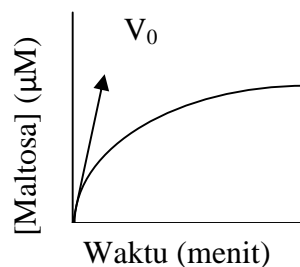
#### k. Analisis Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase oleh Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Penghambatan  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak Bidara Upas dan Kayu kuning dianalisis dengan metode Miyazawa *et al.* (2005) yang dimodifikasi. Sebanyak 100  $\mu\text{l}$  maltosa 0,125 M dimasukkan ke dalam *eppendorf* yang berlabel  $C^+$ ,  $C^-$ ,  $S^+$ , dan  $S^-$ . Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK ditambahkan ke dalam *eppendorf*  $S^+$  dan  $S^-$  sedangkan  $C^+$  dan  $C^-$  ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  DMSO. Setelah itu ditambahkan 190  $\mu\text{l}$  buffer fosfat pH 7 ke dalam setiap *eppendorf*. Larutan divortex dan ditambahkan 10  $\mu\text{l}$   $\alpha$ -glukosidase (1 unit/ $\mu\text{l}$ ) ke dalam *eppendorf*  $C^+$  dan  $S^+$  sedangkan  $C^-$  dan  $S^-$  ditambahkan akuabides. Larutan diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 jam setelah divortex. Reaksi dihentikan dengan mendidihkan larutan selama 3 menit. Larutan diambil 235  $\mu\text{l}$  dari masing-masing *eppendorf* untuk dimasukkan ke *eppendorf* lain dengan label yang sama setelah dicosmosil. Sebanyak 750  $\mu\text{l}$  buffer fenol pH 7 ditambahkan ke dalam setiap *eppendorf*. Setelah itu ditambah dengan 5  $\mu\text{l}$  peroksidase (0,5 unit/ $\mu\text{l}$ ), 5  $\mu\text{l}$  aminoantipirin (4 mg/ml), dan 5  $\mu\text{l}$  glukosa oksidase (0,8 unit/ $\mu\text{l}$ ). Larutan divortex dan diinkubasi lagi selama 10 menit pada suhu 37° C. Hasil inkubasi dipipet 200  $\mu\text{l}$  dan dimasukkan ke dalam 96-well plates untuk diukur absorbansinya pada 500 nm dengan *microplate readers*. Persen penghambatan  $\alpha$ -

glukosidase oleh masing-masing ekstrak dihitung dengan persamaan 3.1. Standar yang digunakan adalah akarbosa.

#### 1. Kinetika Penghambatan -Amilase oleh Ekstrak yang Paling Berpotensi sebagai Antidiabetik

Kinetika penghambatan -amilase dianalisis dengan metode pada poin j diatas tetapi ada variasi konsentrasi pati terlarut dan waktu inkubasi. Konsentrasi pati terlarut yang digunakan adalah 1%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; dan 0,0625%. Pada masing-masing konsentrasi pati terlarut dilakukan variasi waktu inkubasi 0, 3, 6, 9, 12, 18, dan 21 menit untuk mendapatkan nilai kecepatan awal reaksinya ( $V_0$ ). Nilai  $V_0$  didapat dari pengeplotan antara waktu inkubasi dan konsentrasi produk reaksi yang dihasilkan. Konsentrasi produk dihitung dari persamaan kurva standar maltosa. Gambar 3.1 merupakan bentuk kurva hasil pengeplotan antara waktu inkubasi dan konsentrasi maltosa yang dihasilkan. Nilai  $V_0$  sama dengan kemiringan dari kurva tersebut.



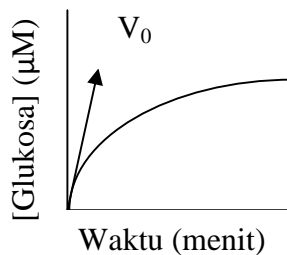
Gambar 3.1 Kurva hasil pengeplotan antara waktu inkubasi dan konsentrasi produknya

Nilai  $V_0$  dari masing-masing konsentrasi pati terlarut digunakan untuk membuat kurva Lineweaver-Burk. Nilai konstanta Michaelis Menten ( $K_M$ ) dan kecepatan maksimum reaksi ( $V_{Max}$ ) dihitung dari persamaan linear kurva Lineweaver-Burk. Menurut Lehninger (1988), Kurva Lineweaver-Burk dibuat melalui pengeplotan antara  $1/[pati\ terlarut]$  dan  $1/V_0$  dari persamaan awalnya berikut:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{Max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{Max}} \quad (\text{Persamaan 3.3})$$

m. Kinetika Penghambatan  $\alpha$ -Glukosidase oleh Ekstrak yang Paling Berpotensi sebagai Antidiabetik

Kinetika penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dilakukan dengan metode pada poin k diatas tetapi ada variasi konsentrasi maltosa dan waktu inkubasi. Konsentrasi maltosa yang digunakan adalah 1 M; 0,5 M; 0,25 M; 0,125 M; dan 0,0625 M. Pada masing-masing konsentrasi maltosa dilakukan variasi waktu inkubasi 0, 10, 20, 40, 60, dan 80 menit untuk mendapatkan nilai kecepatan awal reaksinya ( $V_0$ ). Nilai  $V_0$  didapat dari pengeplotan antara waktu inkubasi dan konsentrasi produknya. Konsentrasi produk dihitung dengan menggunakan kurva standar glukosa. Gambar 3.1 merupakan bentuk kurva hasil pengeplotan antara waktu inkubasi dan konsentrasi glukosa yang dihasilkan. Nilai  $K_M$  dan  $V_{max}$  dihitung dengan cara yang sama seperti perhitungan  $K_M$  dan  $V_{max}$   $\alpha$ -amilase.



Gambar 3.2 Kurva hasil pengeplotan antara waktu inkubasi dan konsentrasi produknya



## **BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN**

Senyawa fenolik dalam daun Bidara upas dan Kayu kuning yang berbeda kepolarannya diekstrak dengan metode maserasi bertingkat. Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah heksana, etil asetat, dan metanol. Pelarut heksana yang bersifat nonpolar akan mengekstrak senyawa fenolik nonpolar, pelarut etil asetat mengekstrak senyawa fenolik semipolar, dan pelarut metanol mengekstrak senyawa fenolik polar. Kromatogram KLT digunakan untuk melihat perbedaan kepolaran senyawa fenolik yang telah terekstrak dengan masing-masing pelarut.

Potensi ekstrak fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antioksidan dan antidiabetik dianalisis dengan spektrofotometri UV-Vis. Radiasi elektromagnetik yang dipancarkan oleh sumbernya dalam spektrofotometer UV-Vis akan diserap oleh molekul-molekul tertentu dalam larutan sehingga menurunkan intensitasnya yang mencapai detektor. Fraksi radiasi elektromagnetik yang mencapai detektor digunakan oleh alat untuk menentukan besarnya nilai absorbansi larutan. Nilai absorbansi yang terbaca oleh spektrofotometer UV-Vis setara dengan konsentrasi senyawa yang menyerap radiasi tersebut berdasarkan hukum Lambert Beer (lihat Persamaan 2.2).

Potensi ekstrak fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antioksidan dilihat dari kemampuannya dalam meredam radikal bebas sedangkan potensinya sebagai antidiabetik dari kemampuannya dalam menghambat enzim. Radikal bebas yang dianalisis adalah DPPH, anion superoksida, dan hidroksil sedangkan enzimnya adalah  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase. Mekanisme penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase oleh senyawa aktif dalam ekstrak yang paling berpotensi sebagai antidiabetik dilihat dari kinetika penghambatannya. Total flavonoid dalam ekstrak daun Bidara upas dan Kayu kuning digunakan untuk menghubungkan potensinya sebagai antioksidan dan antidiabetik karena analisis dilakukan pada konsentrasi fenolik yang sama. Satuan senyawa fenolik dalam analisis distandarkan pada asam galat.

#### 4.1 Rendemen Maserasi Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Sampel daun Bidara upas dan Kayu kuning diambil di kawasan Taman Nasional Meru Betiri (TNMB). Gambar 4.1 merupakan sampel daun Bidara upas dan Kayu kuning yang telah diambil. Sampel yang telah diambil divalidasi secara langsung oleh Lembaga Taman Nasional Meru Betiri. Validasi berisi keterangan yang menyatakan bahwa sampel yang telah diambil merupakan bagian dari tanaman Kayu kuning dan Bidara upas. Data hasil validasinya ditampilkan dalam Lampiran 1.



Gambar 4.1 Sampel daun Bidara upas (1) dan Kayu kuning (2)

Kandungan air dalam daun dihilangkan melalui pengeringan. Menurut Harborne (1987), pengeringan dapat mematikan jaringan sehingga reaksi hidrolisis oleh enzim dapat dicegah. Air juga merupakan medium pertumbuhan yang baik untuk mikroorganisme sehingga mempercepat pembusukan. Oleh sebab itu perlu dilakukan pengeringan untuk menjaga kualitas simplisia.

Simplisia yang telah kering dan memiliki ukuran partikel yang seragam dimaserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi simplisia yang dilakukan pada suhu ruang menggunakan pelarut yang sesuai untuk senyawa target dengan pengadukan atau pengocokan. Maserasi simplisia daun Bidara upas dan Kayu kuning dilakukan dengan waktu inkubasi selama 72 jam sambil dikocok dengan *shaker*. Pelarut akan masuk ke dalam sel-sel simplisia dan melarutkan senyawa-senyawa dalam sel sesuai dengan tingkat kepolaran pelarut yang digunakan. Heksana

merupakan pelarut nonpolar sehingga melarutkan senyawa nonpolar dalam sel sedangkan etil asetat dan metanol merupakan pelarut semipolar dan polar sehingga melarutkan senyawa yang semipolar dan polar. Senyawa yang telah larut akan membentuk kesetimbangan antara bagian di luar dan di dalam dinding sel. Senyawa yang telah larut dan berada di luar dinding sel simplisia dipisahkan dengan filtrasi menggunakan corong vakum. Filtrat yang mengandung senyawa hasil maserasi dipisahkan dari pelarutnya menggunakan evaporator vakum. Enam ekstrak dihasilkan dari maserasi tersebut meliputi heksana Bidara upas (HBU), etil asetat Bidara upas (EBU), metanol Bidara upas (MBU), heksana Kayu kuning (HKK), etil asetat Kayu kuning (EKK), dan metanol Kayu kuning (MKK). Ekstrak heksana (HBU dan HKK) berwarna hijau kekuningan, ekstrak etil asetat (EBU dan EKK) berwarna hijau kehitaman, dan ekstrak metanol (MBU dan MKK) berwarna hijau kecokelatan. Gambar ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK ditunjukkan oleh Lampiran 2.

Rendemen maserasi HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK dihitung berdasarkan perbandingan antara berat simplisia yang dimaserasi dan berat ekstrak yang diperoleh dalam bentuk nilai persentase menggunakan persamaan 3.1. Perhitungan persen rendemen maserasi masing-masing ekstrak ditunjukkan oleh Lampiran 3 dan hasilnya ditampilkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Rendemen maserasi ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning

	Bidara upas (%)	Kayu kuning (%)
Heksana	3,28	2,76
Etil asetat	5,26	4,41
Metanol	17,10	17,00
Total	25,60	24,20

Kenaikan kepolaran pelarut yang digunakan untuk mengekstrak simplisia Bidara upas dan Kayu kuning menyebabkan kenaikan persen rendemennya. Kelebihan pelarut

dengan tingkat kepolaran lebih tinggi dalam melarutkan senyawa dalam simplisia menjadi penyebabnya. Pelarut etil asetat disamping melarutkan senyawa semipolar juga dapat melarutkan senyawa nonpolar yang larut dalam heksana. Pelarut metanol disamping melarutkan senyawa polar juga dapat melarutkan senyawa yang bersifat semipolar. Pernyataan ini didukung oleh kromatogram KLT (lihat Gambar 4.5). Kromatogram tersebut menunjukkan bahwa beberapa *spot* yang muncul pada fraksi yang lebih nonpolar juga muncul pada fraksi dengan kepolaran di atasnya. Kondisi ini menyebabkan senyawa-senyawa yang tidak ikut terekstrak dengan pelarut heksana akan ikut terekstrak dengan pelarut etil asetat. Akibatnya etil asetat memiliki rendemen yang lebih tinggi dari heksana. Metanol memiliki nilai rendemen tertinggi karena memungkinkan untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang tidak ikut terekstrak dengan heksana dan etil asetat.

Ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK hasil maserasi dilarutkan dengan metanol untuk analisis total fenolik dan flavonoid. Metanol dipilih sebagai pelarut semua ekstrak karena memiliki kemampuan melarutkan senyawa fenolik dari polar sampai nonpolar. Konsentrasi ekstrak yang digunakan untuk analisis total fenolik dan flavonoid ditampilkan pada Lampiran 4.

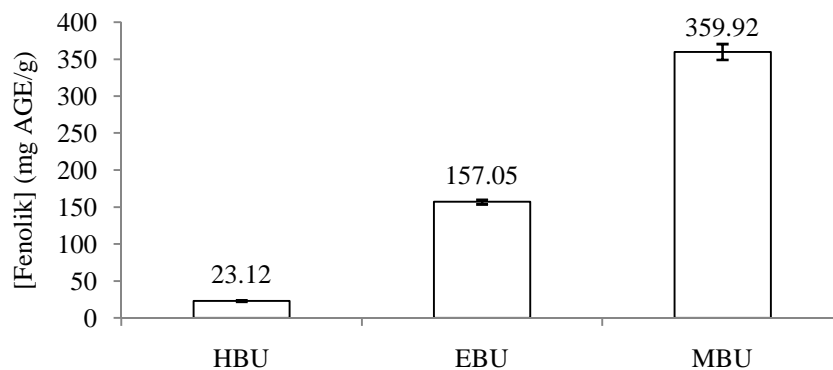
#### **4.2 Total Fenolik Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning**

Total fenolik dalam ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning dianalisis berdasarkan kemampuannya mereduksi reagen Folin-Ciocalteu. Senyawa fenolik diubah menjadi bentuk aktifnya yaitu ion fenolat dengan menggunakan natrium karbonat. Gambar 2.27 merupakan reaksi pembentukan ion fenolat dari asam galat yang digunakan sebagai standar dalam analisis ini. Reagen Folin-Ciocalteu yang berwarna kuning akan direduksi oleh ion fenolat sehingga menghasilkan kompleks yang berwarna biru. Warna biru dari reaksi tersebut diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimumnya yaitu 750 nm. Nilai absorbansi tersebut setara dengan konsentrasi senyawa fenolik yang ada dalam larutan sesuai dengan hukum Lambert Beer (lihat Persamaan 2.2).

Total fenolik dalam ekstrak distandarkan pada asam galat sehingga nilainya dihitung dari persamaan kurva standar asam galat. Kurva standar asam galat dibuat dengan mengukur absorbansi larutan yang mengandung asam galat dengan konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi asam galat yang digunakan untuk membuat kurva standar adalah 1,96; 3,93; 5,89; 7,85; dan 9,82  $\mu\text{g/ml}$ . Nilai absorbansi dari masing-masing konsentrasi diukur pada 750 nm dan hasilnya digunakan untuk membuat kurva standar dengan mengplotkan antara konsentrasi dan absorbansinya. Persamaan linear  $y = 0.076x - 0.037$  dengan linearitas 0,990 dihasilkan dari pengeplotan tersebut. Kurva standar asam galat dan perhitungan total fenolik ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning ditampilkan pada Lampiran 5.

#### 4.2.1 Total Fenolik Ekstrak Daun Bidara Upas

Hasil perhitungan total fenolik ekstrak daun Bidara upas ditunjukkan oleh Gambar 4.2



Gambar 4.2 Total fenolik ekstrak daun Bidara upas

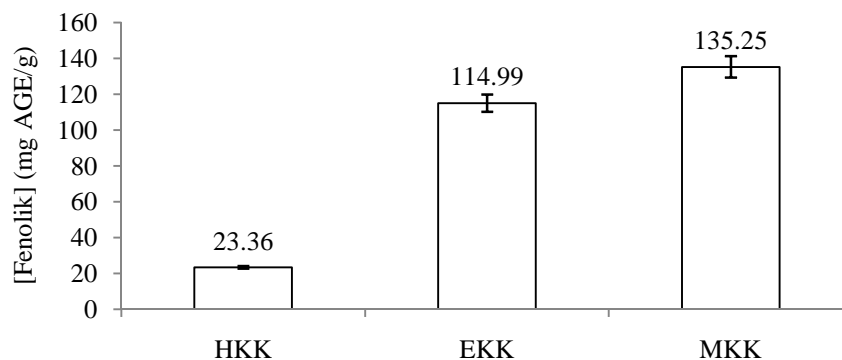
Total fenolik ekstrak daun Bidara upas meningkat seiring dengan peningkatan kepolaran pelarut yang digunakan untuk mengekstraknya. Pelarut metanol memiliki total fenolik tertinggi karena bersifat paling polar. Kelebihan metanol yang mampu membentuk ikatan hidrogen, interaksi dipol-dipol dan van der Waals dengan senyawa fenolik dalam Bidara upas mungkin menjadi penyebabnya. Metanol dapat melarutkan senyawa fenolik yang bersifat polar sampai nonpolar. Senyawa fenolik yang polar

dan semipolar mampu membentuk ikatan hidrogen atau interaksi dipol-dipol dengan metanol. Pernyataan ini didukung oleh kromatogram KLT (lihat Gambar 4.5). Kromatogram tersebut menunjukkan bahwa beberapa *spot* yang muncul pada fraksi etil asetat juga muncul dalam fraksi metanol. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa fenolik yang bersifat semipolar juga larut dalam metanol. Senyawa fenolik nonpolar juga memiliki kemungkinan larut dalam metanol karena dapat membentuk interaksi van der Waals. Akibatnya senyawa fenolik nonpolar sampai semipolar yang tidak ikut terekstrak dengan pelarut heksana dan etil asetat akan terekstrak dengan metanol sehingga totalnya menjadi tertinggi.

Ekstrak MBU memiliki total fenolik tertinggi sehingga memungkinkan untuk membentuk ion fenolat yang lebih tinggi dari EBU dan HBU. Akibatnya konsentrasi reagen Folin-Ciocalteu yang tereduksi dengan MBU juga tertinggi. Hal ini menyebabkan intensitas warna biru dalam larutan MBU tertinggi sehingga absorbansinya pada 750 nm juga tertinggi. Peningkatan nilai absorbansi larutan sebanding dengan konsentrasi senyawa fenoliknya.

#### 4.2.2 Total Fenolik Ekstrak Daun Kayu Kuning

Hasil perhitungan total fenolik ekstrak daun Kayu kuning ditunjukkan oleh Gambar 4.3



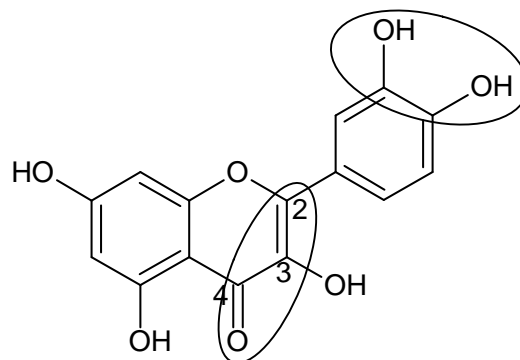
Gambar 4.3 Total fenolik ekstrak daun Kayu kuning

Total fenolik ekstrak daun Kayu kuning juga meningkat seiring dengan peningkatan kepolaran pelarut yang digunakan untuk mengekstraknya. Fraksi metanol dari ekstrak Kayu kuning juga memiliki total fenolik tertinggi. Kelebihan fraksi metanol yang dijelaskan pada poin 4.2.1 mungkin menjadi penyebabnya.

### 4.3 Total Flavonoid Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Flavonoid merupakan senyawa fenolik yang memiliki dua cincin aromatik dengan struktur dasar 1,3-difenilpropana. Flavonoid merupakan anggota dari senyawa fenolik yang telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan yang baik dan beberapa diantaranya juga inhibitor enzim. Kuersetin dan luteolin terbukti menghambat  $\alpha$ -glukosidase dari ragi yang lebih besar dari akarbosa (Li *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2000). Menurut Piparo *et al.* (2008), flavonol dan flavon juga berpotensi sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase karena mampu membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitiknya. Gugus hidroksil dari flavonol dan flavon dapat membentuk ikatan yang stabil dengan sisi katalitik  $\alpha$ -amilase.

Senyawa flavonoid yang memiliki gugus katekol dan ikatan rangkap pada C2-C3 serta gugus 4-okso memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang tinggi (Amic *et al.*, 2007). Gugus katekol, ikatan rangkap pada C2-C3, dan gugus 4-okso dari kuersetin ditunjukkan dalam lingkaran pada Gambar 4.4.

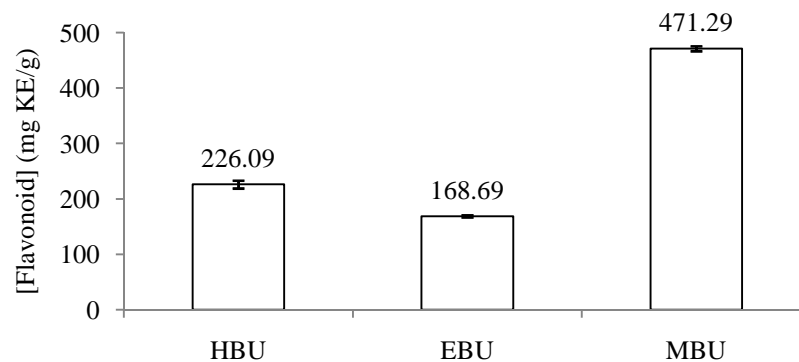


Gambar 4.4 Gugus fungsi flavonoid dengan aktivitas antioksidan yang tinggi

Keistimewaan senyawa flavonoid dengan ciri-ciri seperti Gambar 4.4 menyebabkan perlu dianalisis totalnya untuk menghubungkan potensi ekstrak sebagai antioksidan dan antidiabetik. Analisisnya didasarkan pada pembentukan kompleks antara gugus katekol yang telah teroksidasi dengan logam aluminium. Pada kondisi basa kompleks tersebut berwarna kuning yang memiliki panjang gelombang maksimum 415 nm untuk kuersetin. Gambar 2.28 merupakan reaksi pembentukan warna dari kuersetin yang digunakan sebagai standar dalam analisis ini. Total flavonoid ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning dihitung dari persamaan kurva standar kuersetin. Kurva tersebut dibuat dengan mengukur absorbansi larutan yang mengandung senyawa kuersetin pada konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi kuersetin yang digunakan untuk membuat kurva standar adalah 2,11; 4,22; 8,44; 16,90; dan 33.70  $\mu\text{g/ml}$ . Absorbansi dari masing-masing konsentrasi digunakan untuk membuat kurva standar dengan mengplotkan antara konsentrasi kuersetin dan absorbansinya. Persamaan linear  $y = 0.015x + 0.016$  dengan linearitas 0,994 dihasilkan dari pengeplotan tersebut. Kurva standar kuersetin dan perhitungan total flavonoid ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning ditampilkan pada Lampiran 6.

#### 4.3.1 Total Flavonoid Ekstrak Daun Bidara Upas

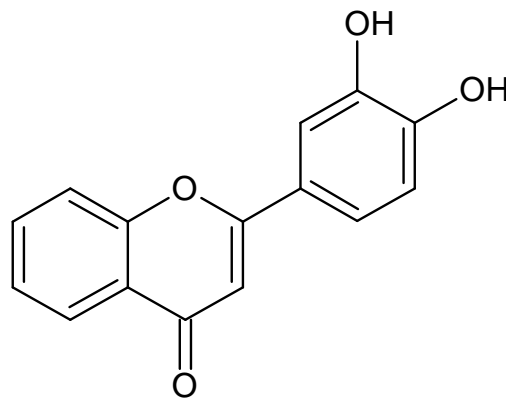
Hasil perhitungan total flavonoid ekstrak daun Bidara upas ditunjukkan oleh Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Total flavonoid ekstrak daun Bidara upas



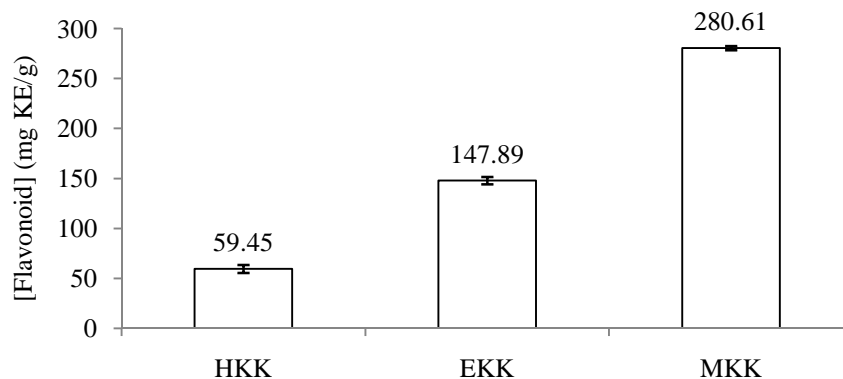
Fraksi metanol dari ekstrak daun Bidara upas memiliki total flavonoid tertinggi diikuti dengan fraksi heksana. Pola ini berbeda dengan pola total fenoliknya karena total fenolik HBU lebih kecil dari EBU (lihat Gambar 4.2). Keberadaan senyawa flavonoid nonpolar dengan gugus katekol seperti 3,4-dihidroksiflavan dapat menjadi penyebabnya. Gambar 4.6 merupakan struktur 3,4-dihidroksiflavan. Senyawa 3,4-dihidroksiflavan hanya mampu menyumbangkan maksimal 2 atom hidrogen ketika bereaksi dengan natrium karbonat sedangkan asam galat mampu menyumbangkan 3 atom hidrogen. Akibatnya dibutuhkan lebih dari satu molekul 3,4-dihidroksiflavan untuk membentuk kesetaraan dengan satu molekul asam galat sehingga total fenoliknya menjadi lebih rendah dari total flavonoidnya. Senyawa 3,4-dihidroksiflavan hanya membutuhkan satu molekul untuk membentuk kesetaraan dengan kuersetin dalam analisis total flavonoid karena sama-sama memiliki satu gugus katekol.



Gambar 4.6 Struktur 3,4 -dihidroksiflavan

#### 4.3.2 Total Flavonoid Ekstrak Daun Kayu Kuning

Hasil perhitungan total flavonoid ekstrak daun Kayu kuning ditunjukkan oleh Gambar 4.7.



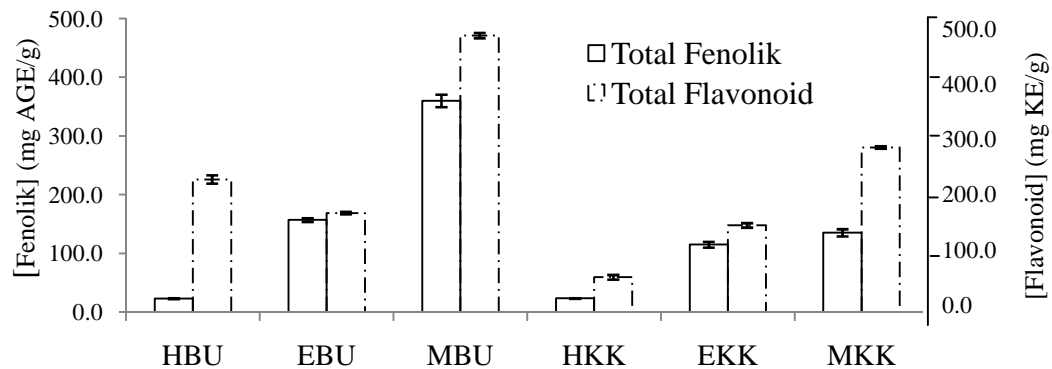
Gambar 4.7 Total flavonoid ekstrak daun Kayu kuning

Total flavonoid ekstrak daun Kayu kuning meningkat seiring dengan peningkatan pelarut yang digunakan untuk mengekstraknya. Pola ini mirip dengan pola total fenoliknya (lihat Gambar 4.2). Flavonoid merupakan bagian dari senyawa fenolik sehingga ekstrak yang memiliki total fenolik lebih tinggi juga berpeluang memiliki total flavonoid yang lebih tinggi.

#### 4.4 Perbandingan Total Fenolik dan Flavonoid Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Total flavonoid dalam tanaman faktanya selalu lebih kecil atau sama dengan total fenoliknya karena flavonoid merupakan bagian dari senyawa fenolik. Tanaman yang memiliki total flavonoid sama dengan total fenolik berarti hanya terjadi biosintesis flavonoid sebagai senyawa fenoliknya. Analisis total fenolik dan flavonoid bertujuan untuk menentukan konsentrasi senyawa fenolik dan flavonoid yang ada dalam tanaman tersebut. Hasil analisis total flavonoid lebih tinggi dari fenoliknya menjadi mungkin ketika terdapat pengganggu seperti asam kafeat. Menurut Chandran *et al.* (2013), ekstrak etanol dan air tanaman *Aegle tamilnadensis* memiliki total flavonoid lebih tinggi dari total fenoliknya. Total flavonoid ekstrak metanol *Begonia malabarica* Lam. dan *Begonia floccifera* Bedd. juga lebih besar dari total fenoliknya (Kalpandevi & Mohan, 2012).

Perbandingan total fenolik dan flavonoid ekstrak heksana, etil asetat, dan metanol dari tanaman Bidara upas dan Kayu kuning ditampilkan oleh Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Perbandingan total fenolik dan flavonoid ekstrak daun Bidara upas dan Kayu kuning

Total flavonoid ekstrak heksana, etil asetat, dan metanol dari tanaman Bidara upas dan Kayu kuning lebih tinggi dari fenoliknya. Keberadaan senyawa fenolik selain flavonoid dengan gugus katekol seperti asam kafeat dapat menjadi penyebabnya. Asam kafeat merupakan senyawa intermediet dalam biosintesis senyawa fenolik seperti lignan dan tanin (lihat Gambar 2.11). Gugus katekol dari asam kafeat dapat mengompleks dengan aluminium sehingga pada kondisi basa memiliki warna yang menambah absorbansi pada pengukuran total flavonoid. Akibatnya total flavonoid yang terukur lebih besar dari yang sebenarnya.

#### 4.5 Kromatogram Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Perbedaan kepolaran senyawa fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning yang terekstrak dengan pelarut heksana, etil asetat, dan metanol dianalisis dengan KLT. Senyawa fenolik yang berbeda kepolarannya menyebabkan perbedaan interaksi dengan fase diam dan fase gerak sehingga menghasilkan *spot-spot* yang berbeda. Silika gel 60 F<sub>254</sub> yang digunakan sebagai fase diam memiliki gugus silanol yang dapat membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa fenolik. Senyawa fenolik dengan substituen hidroksil lebih banyak bersifat lebih polar sehingga berinteraksi lebih kuat

dengan fase diamnya karena jumlah ikatan hidrogen yang dapat dibentuk lebih banyak. Hal ini menyebabkan senyawa tersebut lebih sulit melewati fase diam sehingga *spot* hasil pemisahannya muncul pada jarak yang dekat dengan titik awal penotolan.

Ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, EKK, dan MKK dengan konsentrasi fenolik yang sama ditotolkan pada plat silika dengan volume penotolan yang sama. Metanol yang merupakan pelarut semua ekstrak digunakan sebagai kontrol. *Spot-spot* hasil pemisahan divisualisasi menggunakan reagen spesifik untuk senyawa fenolik yaitu DPPH. Larutan DPPH dalam metanol berwarna ungu dan berubah menjadi kuning pucat ketika tereduksi oleh senyawa fenolik. Gambar 2.29 merupakan contoh interaksi senyawa fenolik dengan gugus silanol silika gel dan reaksinya dengan DPPH yang menghasilkan senyawa yang berwarna kuning pucat. Kromatogram KLT senyawa fenolik ekstrak daun Bidara upas dan Kayu kuning ditunjukkan oleh Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Kromatogram ekstrak fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning

*Spot* terbanyak pada kromatogram KLT terdapat pada fraksi metanol untuk Bidara upas dan Kayu kuning yang diikuti dengan fraksi etil asetat. *Spot-spot* yang muncul

pada plat menunjukkan senyawa fenolik yang telah terpisah. Beberapa *spot* yang muncul pada fraksi etil asetat juga muncul dalam fraksi metanol. Hal ini menunjukkan bahwa metanol juga mampu melarutkan senyawa fenolik yang larut dalam etil asetat. Etil asetat disamping melarutkan senyawa semipolar juga dapat melarutkan senyawa nonpolar sehingga terdapat *spot* yang sama antara etil asetat dan heksana.

Perbedaan kepolaran senyawa fenolik yang telah terpisah dilihat dari nilai *Retardation factor* (Rf) yang dihasilkan oleh masing-masing *spot*. Nilai Rf didapatkan dari perbandingan antara jarak yang ditempuh senyawa fenolik (*spot*) dengan jarak tempuh fase geraknya. Fase gerak yang digunakan adalah campuran etil asetat-asam format-air (82:9:9, v/v/v). Nilai Rf yang lebih kecil menunjukkan kepolaran yang lebih tinggi karena jarak tempuh senyawa lebih dekat dari titik awal penotolan akibat interaksinya dengan fase diam lebih kuat. Perhitungan nilai Rf masing-masing *spot* ditampilkan pada Lampiran 7 dan hasilnya ditampilkan dalam Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Nilai *Retardation factor* (Rf) ekstrak daun Bidara upas dan Kayu kuning

Nilai Rf	Bidara Upas			Kayu Kuning		
	Heksana	Etil Asetat	Metanol	Heksana	Etil Asetat	Metanol
0,081				-	-	++
0,112	-	-	+++++			
0,144				-	-	++
0,262				-	-	+++
0,338	-	-	+			
0,350				-	+	++
0,406	-	-	+			
0,525				-	++	+++
0,556	-	+++	++			
0,719	-	++++	++			
0,781	-	+++	-			
0,856	+++++	++++	-	+++++	++++	-
0,875	-	-	++++			

Tanda (-) menunjukkan tidak ada *spot* dan tanda (+) menunjukkan ketebalan *spot*

Ekstrak Bidara upas memiliki 8 nilai Rf yang berbeda sedangkan Kayu kuning 6 nilai Rf. Hal ini menunjukkan bahwa pemisahan senyawa fenolik dengan fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub> dan fase gerak campuran etil asetat-asam format-air (82:9:9, v/v/v) mampu memisahkan 8 senyawa fenolik dari ekstrak Bidara upas dan 6 senyawa fenolik dari Kayu kuning. Fraksi metanol Bidara upas memiliki 6 nilai Rf, etil asetat 4 nilai, dan heksannya 1 nilai. Fraksi metanol Kayu kuning memiliki 5 nilai Rf, etil asetat 3 nilai, dan heksannya 1 nilai. Nilai Rf dari fraksi metanol secara umum paling kecil dibanding fraksi etil asetat dan heksana. Hal ini disebabkan oleh kepolaran metanol yang paling tinggi dibandingkan etil asetat dan heksana sehingga senyawa fenolik yang terekstrak dengan pelarut tersebut juga bersifat paling polar. Senyawa fenolik yang lebih polar memiliki jumlah substituen hidroksil yang lebih banyak dibandingkan senyawa fenolik semipolar dan nonpolar pada berat molekul yang sama. Substituen hidroksil yang lebih banyak akan membentuk ikatan hidrogen dengan silika yang lebih banyak juga. Akibatnya terjadi interaksi yang lebih kuat sehingga jarak tempuhnya menjadi lebih pendek yang mengakibatkan hasil perhitungan nilai Rf menjadi lebih kecil.

#### **4.6 Potensi Antioksidan Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning**

Potensi ekstrak fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antioksidan dianalisis secara semikuantitatif dan kuantitatif. Analisis semikuantitatif dengan *dot-blot* sedangkan analisis kuantitatifnya dengan peredaman radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil. Analisis semikuantitatif bertujuan untuk mengetahui potensi awal dari ekstrak sebagai antioksidan yang didukung oleh data-data hasil analisis kuantitatif. Vitamin C dipilih sebagai standar dalam analisis antioksidan karena senyawa tersebut sudah terbukti sebagai antioksidan yang baik dan sudah beredar dipasaran. Potensi ekstrak fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning sebagai peredam radikal anion superoksida dan hidroksil dilihat dari nilai persen peredamannya pada konsentrasi ekstrak yang sama. Ekstrak dengan persen

peredaman yang lebih tinggi dianggap lebih berpotensi karena mampu meredam radikal dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Khusus untuk radikal DPPH ditentukan nilai  $IC_{50}$  masing-masing ekstraknya. Nilai  $IC_{50}$  yang lebih kecil menunjukkan potensi yang lebih baik karena nilai  $IC_{50}$  menunjukkan besarnya konsentrasi ekstrak yang dibutuhkan untuk menurunkan 50% aktivitas radikal DPPH. Nilai  $IC_{50}$  yang lebih kecil menunjukkan konsentrasi ekstrak yang dibutuhkan untuk menurunkan 50% aktivitas radikal DPPH juga lebih kecil. Radikal DPPH digunakan untuk menentukan potensi ekstrak sebagai antioksidan secara umum sedangkan potensi ekstrak sebagai antioksidan radikal yang lebih spesifik seperti anion superoksida dan hidroksil juga perlu dianalisis. Radikal anion superoksida dan hidroksil merupakan jenis-jenis radikal yang disintesis dalam tubuh melalui reaksi autooksidasi glukosa pada penderita diabetes melitus.

#### 4.6.1 Hasil Analisis *Dot-Blot* Ekstrak Fenolik Bidara Upas dan Kayu Kuning

Hasil analisis *dot-blot* digunakan untuk mengetahui potensi awal dari ekstrak sebagai antioksidan. Ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning dengan konsentrasi fenolik yang sama ditotolkan pada plat silika gel 60 F<sub>254</sub> dengan volume penotolan yang sama. Larutan DPPH dalam metanol yang berwarna ungu digunakan sebagai visualisator dengan menyemprotkannya pada plat. Warna ungu dari DPPH akan berubah menjadi kuning pucat setelah direduksi oleh senyawa fenolik. Gambar 2.29 merupakan contoh interaksi senyawa fenolik dengan gugus silanol silika gel dan reaksinya dengan DPPH yang menghasilkan senyawa yang berwarna kuning pucat. Kepekatan warna kuning pucat sebanding dengan kekuatan ekstrak dalam mereduksi radikal DPPH. Warna kuning pucat yang lebih pekat menunjukkan kemampuan ekstrak dalam mereduksi DPPH lebih kuat. Vitamin C digunakan sebagai standar positif dan metanol yang merupakan pelarut ekstrak digunakan sebagai kontrol negatifnya. Hasil analisis *dot-blot* ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning ditunjukkan oleh Gambar 4.10.

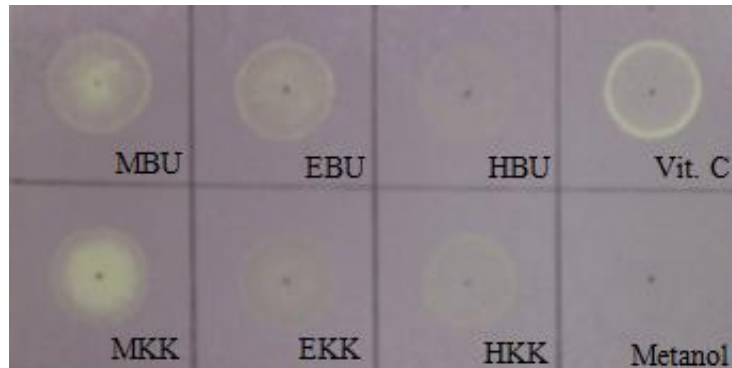


Foto 4.10 Hasil analisis *dot-blot* ekstrak daun Bidara upas dan Kayu kuning

Fraksi metanol dari Bidara upas dan Kayu kuning memiliki warna kuning pucat yang paling pekat. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa fenolik dalam fraksi metanol dari Bidara upas dan Kayu kuning memiliki kemampuan mereduksi radikal DPPH paling kuat. Fraksi metanol disamping memiliki total flavonoid tertinggi juga melarutkan senyawa fenolik paling polar. Senyawa fenolik polar memiliki jumlah substituen hidroksil yang lebih banyak dibanding senyawa fenolik semipolar dan nonpolar pada berat molekul yang sama. Hal ini menyebabkan jumlah atom hidrogen yang mampu disumbangkan untuk mereduksi radikal DPPH juga lebih banyak. Akibatnya warna kuning pucat pada fraksi metanol paling pekat.

Ekstrak MBU dan EBU dari Bidara upas memiliki potensi lebih baik sebagai peredam radikal DPPH dibandingkan vitamin C karena memiliki warna kuning pucat yang lebih pekat. Ekstrak HBU dari Bidara upas memiliki potensi yang sebaliknya karena memiliki kepekatan warna kuning pucat yang lebih lemah dari vitamin C. Ekstrak MKK dari Kayu kuning memiliki potensi lebih baik sebagai peredam radikal DPPH dibandingkan vitamin C karena memiliki warna kuning pucat yang lebih pekat. Ekstrak HKK dan EKK dari Kayu kuning memiliki potensi yang sebaliknya karena memiliki kepekatan warna kuning pucat yang lebih lemah dari vitamin C.

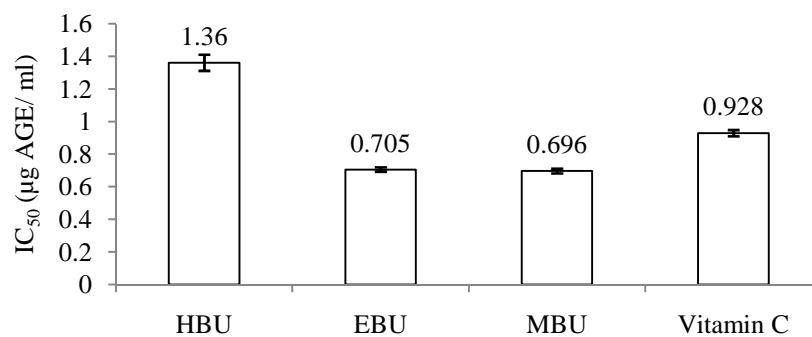


#### 4.6.2 Peredaman Radikal DPPH oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Hasil analisis semikuantitatif *dot-blot* didukung oleh data hasil analisis kuantitatif menggunakan radikal yang sama yaitu DPPH. Potensi ekstrak fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning sebagai peredam radikal DPPH secara kuantitatif dilihat dari nilai  $IC_{50}$  masing-masing ekstrak. Nilai  $IC_{50}$  dihitung dari persamaan linear yang dibentuk antara log konsentrasi dan persen peredaman pada tiap-tiap konsentrasi ekstrak (lihat Persamaan 2.3 dan 2.4). Konsentrasi ekstrak yang digunakan sama untuk semua ekstrak yaitu 0,10; 0,30; 1,00; 3,00; dan 3,70  $\mu\text{g AGE/ml}$ . Konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi akan menyebabkan konsentrasi radikal DPPH yang tereduksi semakin banyak. Gambar 2.30 menunjukkan reaksi peredaman radikal DPPH oleh senyawa fenolik. Peningkatan konsentrasi radikal DPPH yang tereduksi menyebabkan warna ungu larutan semakin menghilang sehingga absorbansinya pada 515 nm semakin kecil. Hal ini akan menyebabkan nilai persen peredaman naik seiring dengan kenaikan konsentrasi ekstrak yang digunakan untuk meredamnya. Perhitungan nilai  $IC_{50}$  radikal DPPH oleh ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning ditampilkan dalam Lampiran 8.

##### a. Peredaman Radikal DPPH oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas

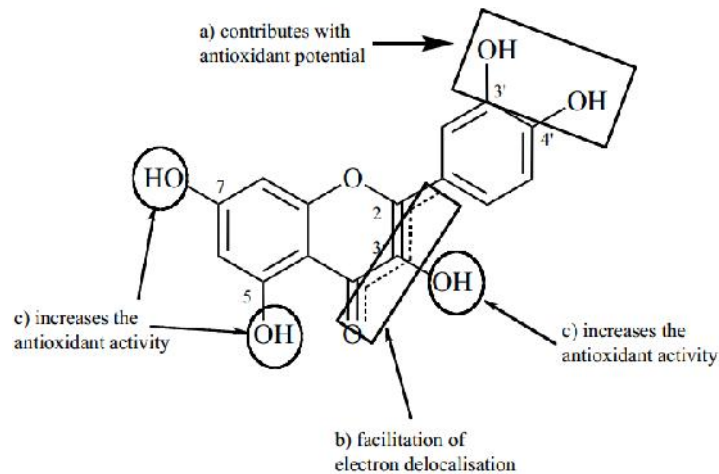
Hasil perhitungan peredaman radikal DPPH oleh ekstrak Bidara upas yang dinyatakan dalam nilai  $IC_{50}$  ditunjukkan oleh Gambar 4.11.



Gambar 4.11 Nilai  $IC_{50}$  radikal DPPH oleh ekstrak Bidara upas

Potensi ekstrak fenolik Bidara upas sebagai peredam radikal DPPH meningkat seiring dengan peningkatan kepolaran pelarut yang digunakan untuk mengekstraknya. Fraksi metanol memiliki potensi paling baik sebagai peredam radikal DPPH karena memiliki nilai  $IC_{50}$  terkecil. Kromatogram KLT ekstrak Bidara upas (lihat Gambar 4.9) menunjukkan bahwa senyawa fenolik yang terekstrak dengan metanol memiliki kepolaran tertinggi dibanding etil asetat dan heksana. Senyawa fenolik polar memiliki jumlah substituen hidroksil yang lebih banyak dibanding senyawa fenolik semipolar dan nonpolar pada berat molekul yang sama. Akibatnya jumlah atom hidrogen yang mampu disumbangkan untuk mereduksi radikal DPPH oleh senyawa fenolik yang lebih polar lebih banyak. Hal ini yang mungkin menjadi penyebab fraksi metanol paling kuat mereduksi radikal DPPH sehingga nilai  $IC_{50}$ nya terkecil. Ekstrak MBU dan EBU lebih berpotensi dalam meredam radikal DPPH dibandingkan vitamin C karena memiliki nilai  $IC_{50}$  yang lebih kecil. Hal ini mendukung hasil analisis *dot-blot* karena MBU dan HBU juga meredam radikal DPPH paling kuat dalam analisis tersebut. Ekstrak HBU memiliki potensi sebagai peredam radikal DPPH yang sebaliknya karena memiliki nilai  $IC_{50}$  yang lebih besar dari vitamin C.

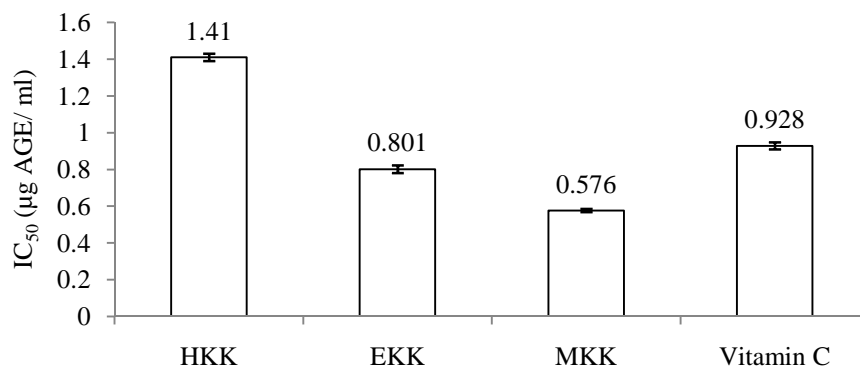
Total flavonoid ekstrak Bidara upas tidak selalu mendukung potensinya sebagai peredam radikal DPPH. Ekstrak HBU memiliki total flavonoid lebih tinggi dari EBU (lihat Gambar 4.5) tetapi kemampuan ekstrak HBU dalam meredam radikal DPPH lebih rendah dari EBU. Menurut Bubols *et al.* (2013), keberadaan substituent hidroksil pada C3, C5, dan C7 meningkatkan aktivitasnya sebagai antioksidan. Senyawa flavonoid dengan struktur tersebut cenderung bersifat semipolar sehingga lebih lebih larut dalam etil asetat. Keberadaan senyawa tersebut dalam EBU meskipun konsentrasinya lebih kecil dapat mereduksi radikal DPPH yang lebih kuat dari senyawa flavonoid nonpolar tanpa substituent tersebut. Gambar 4.12 menunjukkan struktur gugus fungsi flavonoid yang penting dalam menjalankan perannya sebagai antioksidan.



Gambar 4.12 Peran masing-masing gugus fungsi pada senyawa flavonoid (Bubols *et al.*, 2013)

#### b. Peredaman Radikal DPPH oleh Ekstrak Fenolik Daun Kayu Kuning

Hasil perhitungan peredaman radikal DPPH oleh ekstrak fenolik Kayu kuning yang dinyatakan dalam nilai  $IC_{50}$  ditunjukkan oleh Gambar 4.13.



Gambar 4.13 Nilai  $IC_{50}$  radikal DPPH oleh ekstrak Kayu kuning

Kenaikan kepolaran dan total flavonoid ekstrak Kayu kuning mendukung potensinya sebagai peredam radikal DPPH. Fraksi metanol dengan total flavonoid tertinggi (lihat Gambar 4.7) dan kepolaran tertinggi juga memiliki kemampuan meredam radikal DPPH tertinggi. Kelebihan senyawa fenolik polar sebagaimana dijelaskan pada poin

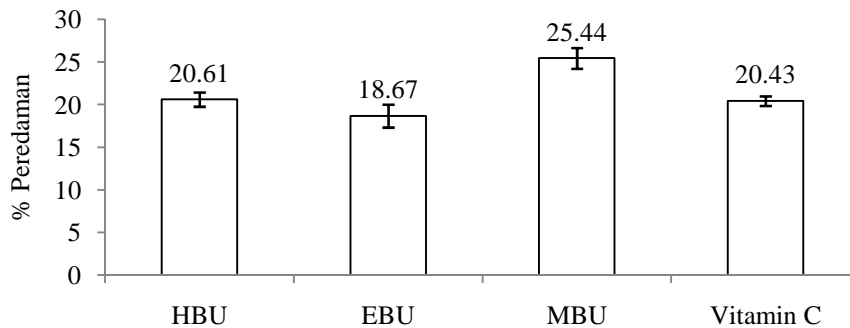
4.6.2 bagian a mungkin menjadi penyebabnya. Ekstrak MKK dan EKK lebih berpotensi sebagai peredam radikal DPPH dibandingkan vitamin C karena memiliki nilai  $IC_{50}$  yang lebih kecil. Ekstrak HKK memiliki potensi yang sebaliknya karena memiliki nilai  $IC_{50}$  yang lebih besar dari vitamin C.

#### 4.6.3 Peredaman Radikal Anion Superoksida oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Radikal anion superoksida merupakan jenis radikal yang pertama diproduksi dalam tubuh oleh reaksi autooksidasi glukosa. Radikal-radikal jenis lain juga diproduksi setelah radikal anion superoksida terbentuk. Radikal anion superoksida secara *in-vitro* dihasilkan dari reaksi autooksidasi pirogalol dalam kondisi basa. Terbentuknya radikal anion superoksida akan mengoksidasi ortoquinon yang merupakan produk pertama reaksi oksidasi dari pirogalol menjadi purpurogalin (lihat Gambar 2.31). Senyawa purpurogalin memiliki panjang gelombang maksimum 320 nm sehingga aktivitas radikal anion superoksida dapat diamati secara tidak langsung dari aktivitas purpurogalin. Konsentrasi radikal anion superoksida yang lebih tinggi menyebabkan produksi purpurogalin juga lebih tinggi sehingga absorbansinya pada 320 juga meningkat. Aktivitas produksi purpurogalin setiap menitnya diamati dengan spektrofotometer UV-Vis selama 4 menit reaksi sehingga didapatkan nilai *slope* yang menunjukkan aktivitas produksinya setiap menit. Penurunan nilai *slope* menunjukkan penurunan konsentrasi radikal anion superoksida yang disebabkan bereaksi dengan senyawa fenolik (lihat Gambar 2.32). Persen peredaman radikal anion superoksida oleh masing-masing ekstrak dengan konsentrasi yang sama dibandingkan untuk menentukan ekstrak yang paling berpotensi. Persamaan 2.5 digunakan untuk menghitung persen peredaman radikal anion superoksida oleh ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning. Perhitungan persen peredaman radikal anion superoksida oleh ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning ditunjukkan oleh Lampiran 9.

a. Peredaman Radikal Anion Seperoksida oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas

Hasil perhitungan peredaman radikal anion seperoksida oleh ekstrak Bidara upas yang dinyatakan dalam persentase ditunjukkan oleh Gambar 4.14.

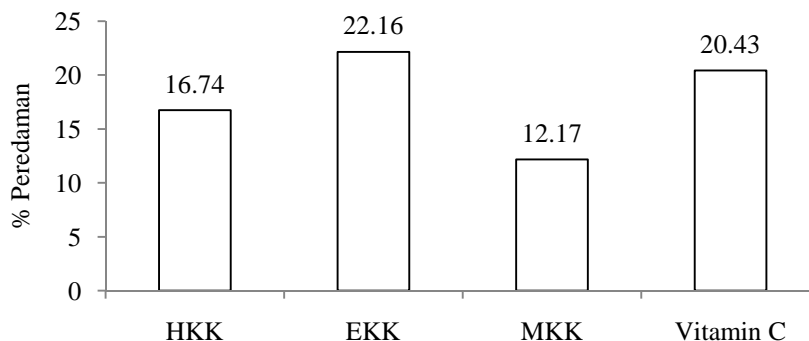


Gambar 4.14 Persen peredaman radikal anion superoksida oleh ekstrak Bidara upas

Kepolaran senyawa fenolik tidak selalu mendukung potensi ekstrak Bidara upas sebagai peredam radikal anion superoksida. Heksana yang mengekstrak senyawa fenolik nonpolar memiliki potensi sebagai peredam radikal anion superoksida lebih baik dari etil asetat. Potensi ekstrak Bidara upas sebagai peredam radikal anion superoksida lebih didukung oleh total flavonoidnya. Kenaikan total flavonoid ekstrak diikuti dengan kenaikan potensinya sebagai peredam radikal tersebut. Ekstrak HBU dan MBU yang memiliki total flavonoid lebih tinggi dari EBU (lihat Gambar 4.5) juga memiliki potensi sebagai peredam radikal anion superoksida yang lebih baik. Ekstrak MBU dan HBU memiliki potensi sebagai peredam radikal anion superoksida yang lebih baik dari vitamin C karena memiliki nilai persen peredaman yang lebih tinggi. Ekstrak EBU memiliki potensi yang sebaliknya karena memiliki nilai persen peredaman yang lebih rendah dari vitamin C.

b. Peredaman Radikal Anion Seperoksida oleh Ekstrak Fenolik Daun Kayu Kuning

Hasil perhitungan peredaman radikal anion seperoksida oleh ekstrak Kayu kuning yang dinyatakan dalam persentase ditunjukkan oleh Gambar 4.15.



Gambar 4.15 Persen peredaman radikal anion superoksida oleh ekstrak Kayu kuning

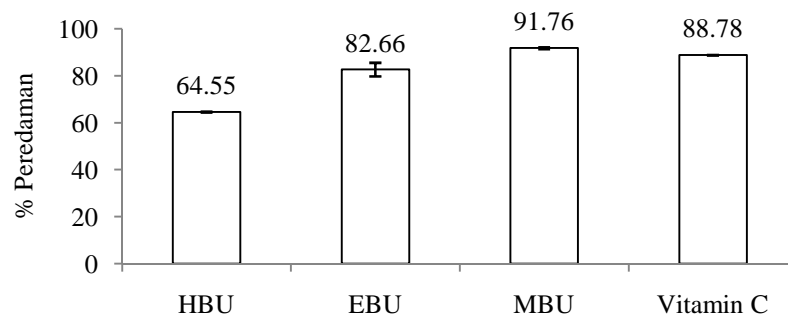
Kepolaran senyawa fenolik dan total flavonoid ekstrak tidak selalu mendukung potensi ekstrak Kayu kuning sebagai peredam radikal anion superoksida. Ekstrak MKK yang memiliki kepolaran dan total flavonoid tertinggi memiliki potensi sebagai peredam radikal anion superoksida terendah. Kepolaran senyawa fenolik dalam MKK yang terlalu tinggi (lihat Tabel 4.2) mungkin tidak mendukung potensinya sebagai peredam radikal anion superoksida. Hal ini disebabkan kondisi analisis yang menggunakan *time scanning*. Reaksi autooksidasi pirogalol dianalisis selama 4 menit reaksi. Keberadaan senyawa fenolik dengan kepolaran yang sangat tinggi mungkin memiliki laju reaksi yang cepat sehingga habis bereaksi diawal. Akibatnya pada pertengahan hingga akhir reaksi tidak bisa meredam radikal anion superoksida yang masih terbentuk. Hal ini akan menyebabkan kenaikan *slope* reaksi karena konsentrasi purpulin semakin meningkat sehingga hasil perhitungan persen peredamannya menjadi rendah. Ekstrak HKK dan MKK memiliki potensi sebagai peredam radikal anion superoksida yang lebih lemah dari vitamin C karena memiliki nilai persen peredaman yang lebih rendah. Ekstrak EKK memiliki potensi yang sebaliknya karena memiliki nilai persen peredaman yang lebih tinggi dari vitamin C.

#### 4.6.4 Peredaman Radikal Hidroksil oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Radikal hidroksil dihasilkan dalam tubuh setelah terjadi reaksi antara hidrogen peroksida dengan radikal anion superoksida yang dikatalis logam transisi. Radikal hidroksil diproduksi secara *in-vitro* melalui reaksi Fenton (lihat Poin 2.9.6). Terbentuknya radikal hidroksil akan menyerang 2-deoksi-D-ribosa yang menghasilkan produk malondialdehid (MDA). Penambahan ekstrak yang mengandung senyawa fenolik menyebabkan terjadinya kompetisi antara senyawa fenolik dan 2-deoksi-D-ribosa untuk bereaksi dengan radikal hidroksil. Terjadinya reaksi antara senyawa fenolik dengan radikal hidroksil (lihat Gambar 2.36) menyebabkan produk MDA tidak terbentuk. Hal ini menyebabkan penurunan intensitas warna pink larutan karena warna pink larutan berasal dari produk reaksi antara MDA dan asam 2-tiobarbiturat (ATB) yaitu MDA-ATB *adduct*. Penurunan intensitas warna pink larutan dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada 532 nm. Kekuatan senyawa fenolik dalam meredam radikal hidroksil sebanding dengan penurunan absorbansi dari larutan tersebut. Penurunan absorbansi yang lebih besar menyebabkan kenaikan persen peredaman radikal hidroksil yang lebih besar. Persen peredaman radikal hidroksil oleh masing-masing ekstrak dengan konsentrasi yang sama dibandingkan untuk menentukan ekstrak yang paling berpotensi. Persamaan 2.3 digunakan untuk menghitung persen peredaman radikal hidroksil oleh ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning yang perhitungannya ditunjukkan oleh Lampiran 10.

##### a. Peredaman Radikal Hidroksil oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas

Hasil perhitungan peredaman radikal hidroksil oleh ekstrak Bidara upas yang dinyatakan dalam persentase ditunjukkan oleh Gambar 4.16.



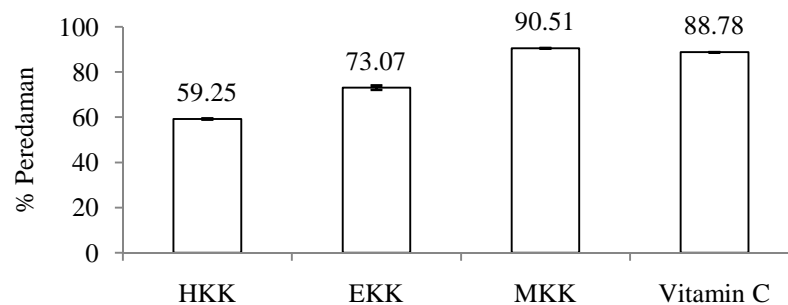
Gambar 4.16 Persen peredaman radikal hidroksil oleh ekstrak Bidara upas

Potensi ekstrak fenolik Bidara upas sebagai peredam radikal hidroksil meningkat seiring dengan peningkatan kepolaran pelarut yang digunakan untuk mengekstraknya. Ekstrak MBU bersifat paling polar sehingga paling berpotensi sebagai peredam radikal hidroksil. Senyawa fenolik yang lebih polar memiliki jumlah substituen hidroksil yang lebih banyak dibanding senyawa fenolik semipolar dan nonpolar pada berat molekul yang sama. Kondisi ini menyebabkan jumlah atom hidrogen yang mampu disumbangkan oleh senyawa fenolik polar untuk mereduksi radikal hidroksil juga lebih banyak. Hal ini yang mungkin menjadi penyebab ekstrak dengan kepolaran yang lebih tinggi juga memiliki aktivitas peredaman yang lebih tinggi meskipun total flavonoidnya lebih rendah seperti pada EBU. Total flavonoid EBU lebih rendah dari HBU (lihat Gambar 4.5) tetapi potensinya sebagai peredam radikal hidroksil lebih tinggi. Ekstrak HBU dan EBU memiliki potensi sebagai peredam radikal hidroksil yang lebih lemah dari vitamin C karena nilai persen peredamannya lebih rendah. Ekstrak MBU memiliki potensi yang sebaliknya karena nilai persen peredamannya lebih tinggi dari vitamin C.

#### b. Peredaman Radikal Hidroksil oleh Ekstrak Fenolik Daun Kayu Kuning

Hasil perhitungan peredaman radikal hidroksil oleh ekstrak Kayu kuning yang dinyatakan dalam persentase ditunjukkan oleh Gambar 4.17.





Gambar 4.17 Persen peredaman radikal hidroksil oleh ekstrak Kayu kuning

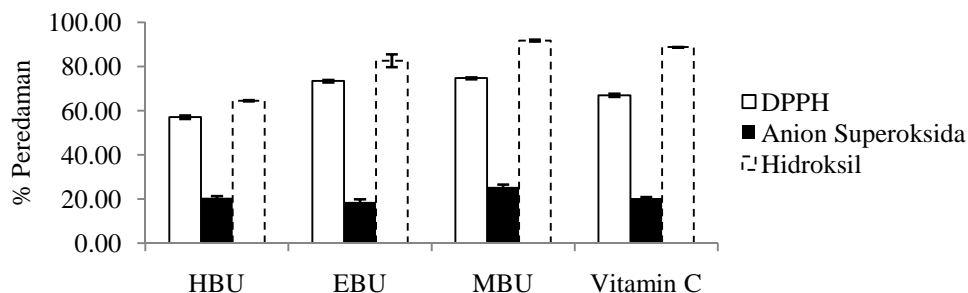
Kepolaran dan total flavonoid ekstrak mendukung potensinya sebagai peredam radikal hidroksil. Ekstrak MKK yang memiliki kepolaran dan total flavonoid tertinggi juga memiliki persen peredaman tertinggi. Ekstrak MKK memiliki potensi sebagai peredam radikal hidroksil lebih baik dari vitamin C karena memiliki nilai persen peredaman lebih tinggi. Kelebihan fraksi metanol dalam meredam radikal hidroksil sebagaimana dijelaskan pada poin 4.6.4 bagian a mungkin menjadi penyebabnya. Ekstrak HKK dan EKK memiliki potensi sebagai peredam radikal hidroksil yang lebih lemah dari vitamin C karena nilai persen peredamannya di bawah vitamin C.

#### 4.6.5 Perbandingan Peredaman Radikal DPPH, Anion Superoksida, dan Hidroksil oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Potensi ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antioksidan dilihat dari kemampuannya meredam radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil. Pada konsentrasi 2  $\mu\text{g}$  AGE/ml kemampuan masing-masing ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning dibandingkan dalam meredam ketiga jenis radikal

##### a. Perbandingan Peredaman Radikal DPPH, Anion Superoksida, dan Hidroksil oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas

Hasil perbandingan peredaman ketiga jenis radikal oleh ekstrak Bidara upas ditampilkan oleh Gambar 4.18.



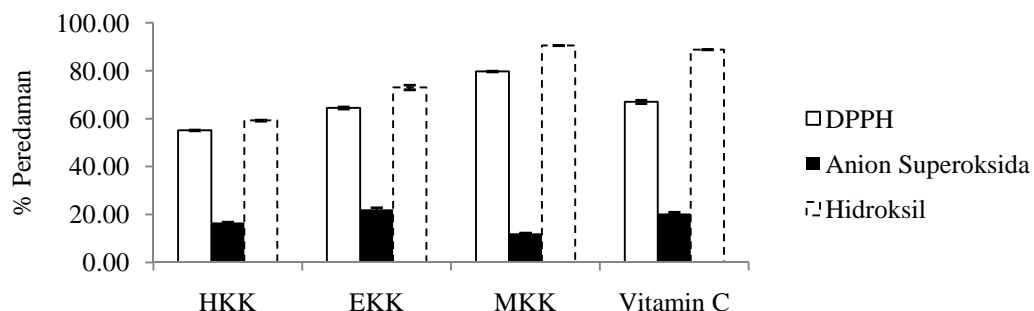
Gambar 4.18 Perbandingan peredaman radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil oleh ekstrak Bidara upas

Radikal hidroksil paling tinggi diredam aktivitasnya oleh semua ekstrak Bidara upas sedangkan radikal anion superoksida paling rendah. Perbedaan jenis radikal menyebabkan perbedaan nilai persen peredamannya karena kereaktifan masing-masing radikal berbeda. Radikal hidroksil merupakan radikal yang paling reaktif karena memiliki struktur yang paling kecil dan tidak mengalami penstabilan terhadap dirinya sendiri seperti radikal DPPH dan anion superoksida. Radikal DPPH dan anion superoksida memiliki kemampuan menstabilkan diri melalui efek resonansi. Hal ini yang mungkin menjadi penyebab persen peredaman kedua radikal tersebut di bawah persen peredaman radikal hidroksil.

Ekstrak EBU dan MBU meredam radikal DPPH yang lebih kuat dari vitamin C. Ekstrak HBU dan MBU meredam radikal anion superoksida yang lebih kuat dari vitamin C. Ekstrak MBU meredam radikal hidroksil yang lebih kuat dari vitamin C. Ekstrak MBU meredam radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil tertinggi dibandingkan ekstrak HBU dan EBU. Hal ini disebabkan total flavonoid MBU paling besar dibandingkan HBU dan EBU sehingga potensinya sebagai antioksidan tertinggi.

b. Perbandingan Peredaman Radikal DPPH, Anion Superoksida, dan Hidroksil oleh Ekstrak Fenolik Daun Kayu Kuning

Hasil perbandingan peredaman ketiga jenis radikal oleh ekstrak Kayu kuning ditampilkan oleh Gambar 4.19.



Gambar 4.19 Perbandingan peredaman radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil oleh ekstrak Kayu kuning

Radikal hidroksil juga paling tinggi diredam aktivitasnya oleh semua ekstrak Kayu kuning sedangkan radikal anion superoksida paling rendah. Perbedaan kereaktifan radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil sebagaimana telah dijelaskan pada poin 4.6.5 bagian a menjadi penyebabnya.

Ekstrak EKK dan MKK meredam radikal DPPH yang lebih kuat dari vitamin C. Ekstrak EKK meredam radikal anion superoksida yang lebih kuat dari vitamin C. Ekstrak MKK meredam radikal hidroksil yang lebih kuat dari vitamin C. Ekstrak MKK meredam radikal DPPH dan hidroksil tertinggi dibandingkan ekstrak HKK dan EKK. Hal ini disebabkan total flavonoid MKK lebih besar dibandingkan HKK dan EKK sehingga potensinya sebagai antioksidan pada kedua radikal tertinggi.

#### 4.7 Potensi Antidiabetik Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Terapi farmakologis antidiabetik dapat dilakukan dengan menghambat -amilase dan -glukosidase. Struktur senyawa fenolik sangat mempengaruhi

potensinya dalam menghambat  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase. Perbedaan struktur senyawa fenolik menyebabkan perbedaan interaksi dan kekuatannya sehingga menyebabkan perbedaan potensi. Potensi ekstrak fenolik Bidara upas dan Kayu kuning sebagai antidiabetik ditentukan dari kemampuannya dalam menghambat  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase. Mekanisme penghambatan oleh ekstrak yang paling berpotensi sebagai antidiabetik dipelajari melalui kinetika penghambatannya. Konsentrasi senyawa fenolik yang digunakan dalam analisis penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase adalah sama yaitu 25  $\mu$ g AGE/ml. Konsentrasi tersebut dipilih karena pada konsentrasi dibawah itu nilai penghambatan beberapa ekstrak yang memiliki potensi rendah masih sangat kecil. Akarbosa merupakan inhibitor  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase yang sudah dipasarkan sehingga digunakan sebagai standar dalam analisis ini.

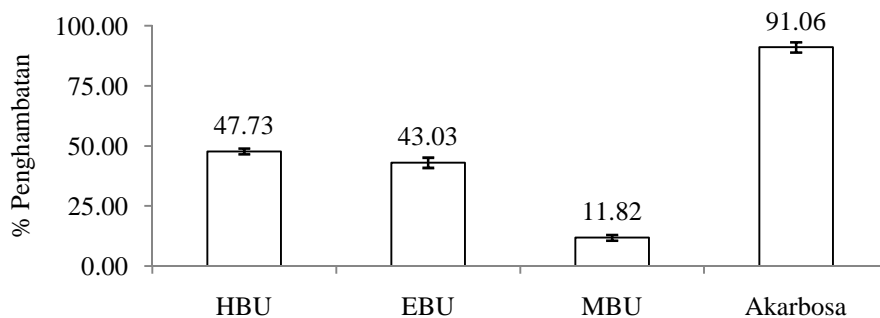
#### 4.7.1 Penghambatan $\alpha$ -Amilase oleh Ekstrak Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Potensi ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning sebagai penghambat  $\alpha$ -amilase dibandingkan dari nilai persen penghambatannya pada konsentrasi fenolik yang sama. Ekstrak yang memiliki nilai persen penghambatan yang lebih besar menunjukkan potensinya sebagai penghambat  $\alpha$ -amilase yang lebih baik karena mampu menghambat aktivitas  $\alpha$ -amilase lebih besar. Nilai persen penghambatan  $\alpha$ -amilase dihitung berdasarkan penurunan gula reduksi hasil reaksi hidrolisis pati terlarut oleh  $\alpha$ -amilase dengan persamaan 3.1. Total gula reduksi hasil reaksi hidrolisis ditentukan dengan menggunakan reagen 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Senyawa DNS yang berwarna kuning akan direduksi oleh gula reduksi menjadi 3-amino-5-nitrosalisilat yang berwarna coklat. Gambar 2.37 merupakan contoh reaksi salah satu gula reduksi dengan DNS. Warna coklat dari 3-amino-5-nitrosalisilat memiliki panjang gelombang maksimum 540 nm. Penurunan konsentrasi gula reduksi akibat penambahan inhibitor  $\alpha$ -amilase dalam ekstrak menyebabkan penurunan absorbansi pada panjang gelombang tersebut. Semakin kuat inhibitor menghambat  $\alpha$ -amilase maka penurunan absorbansinya juga akan semakin besar sehingga nilai persen penghambatannya

menjadi lebih besar. Persen penghambatan  $\alpha$ -amilase ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning dihitung pada Lampiran 11.

a. Persen Penghambatan  $\alpha$ -Amilase oleh Ekstrak Daun Bidara Upas

Hasil perhitungan persen penghambatan  $\alpha$ -amilase oleh ekstrak Bidara upas ditampilkan pada Gambar 4.20.

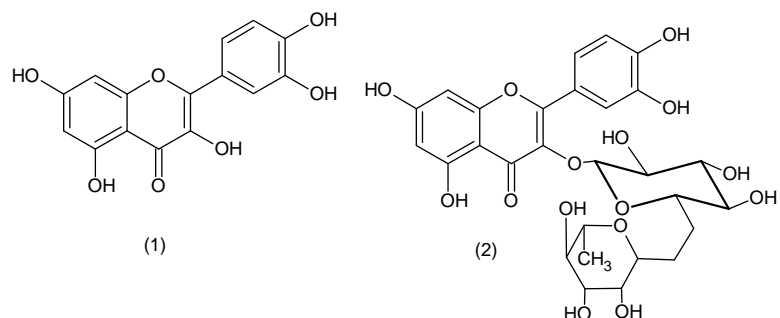


Gambar 4.20 Persen penghambatan  $\alpha$ -amilase oleh ekstrak Bidara upas

Persen penghambatan  $\alpha$ -amilase ekstrak Bidara upas menurun seiring dengan kenaikan kepolaran pelarut yang digunakan untuk mengekstraknya. Ekstrak HBU menghambat  $\alpha$ -amilase tertinggi dibanding EBU dan MBU tetapi nilainya masih dibawah akarbosa. Ekstrak HBU mampu menghambat  $47.73 \pm 1.20\%$  aktivitas  $\alpha$ -amilase pada konsentrasi  $25 \mu\text{g AGE/ml}$  sedangkan akarbosa mampu menghambat  $91,06 \pm 2,15\%$ .

Ekstrak MBU yang diekstrak dengan pelarut yang paling polar memiliki nilai persen penghambatan yang paling kecil. Ekstrak MBU juga memiliki total flavonoid tertinggi (lihat Gambar 4.5). Hal ini menunjukkan bahwa total flavonoid dan kenaikan kepolaran senyawa fenolik tidak mendukung potensi ekstrak Bidara upas sebagai penghambat  $\alpha$ -amilase. Menurut Li *et al.* (2009), senyawa rutin yang bersifat lebih polar dari kuersetin memiliki aktivitas penghambatan terhadap  $\alpha$ -amilase yang lebih rendah karena adanya halangan ruang yang lebih besar. Struktur kuersetin dan rutin ditunjukkan oleh Gambar 4.21. Keberadaan senyawa flavonoid seperti rutin

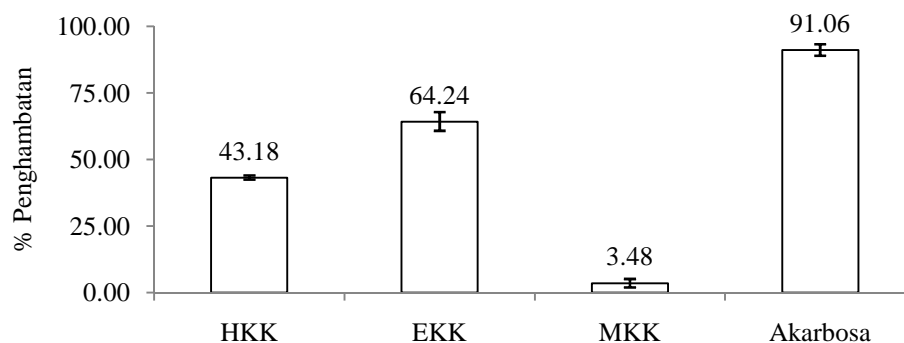
dalam fraksi metanol mungkin menyebabkan aktivitasnya dalam menghambat -amilase menjadi rendah.



Gambar 4.21 Struktur kuersetin (1) dan rutin (2) (Li *et al.*, 2009)

#### b. Persen Penghambatan -Amilase oleh Ekstrak Daun Kayu Kuning

Hasil perhitungan persen penghambatan -amilase oleh ekstrak Kayu kuning ditampilkan pada Gambar 4.21.



Gambar 4.21 Persen penghambatan -amilase oleh ekstrak Kayu kuning

Kepolaran dan total flavonoid ekstrak Kayu kuning tidak selalu mendukung potensinya sebagai penghambatan -amilase. Ekstrak MKK yang paling polar dan memiliki total flavonoid tertinggi menghambat -amilase paling lemah. Ekstrak EKK yang memiliki kepolaran dan total flavonoid diantara HKK dan MKK menghambat -amilase paling tinggi. Kemampuan ekstrak EKK dalam menghambat -amilase

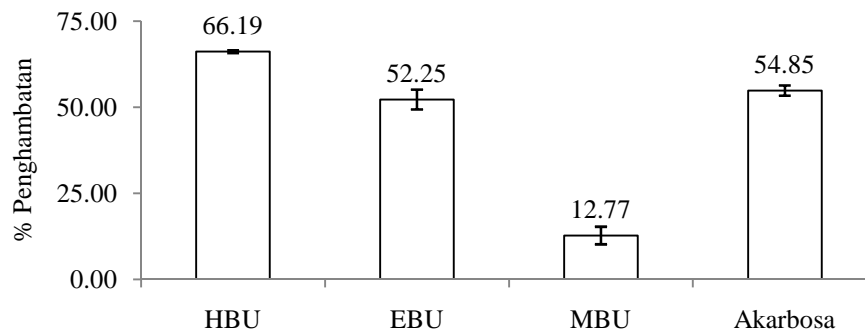
masih dibawah akarbosa. Ekstrak EKK mampu menghambat  $64,24 \pm 3,53\%$  aktivitas  $\alpha$ -amilase pada konsentrasi  $25 \mu\text{g AGE/ml}$  sedangkan akarbosa mampu menghambat  $91,06 \pm 2,15\%$ .

#### 4.7.2 Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Potensi ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning sebagai penghambat  $\alpha$ -glukosidase dibandingkan dari nilai persen penghambatannya pada konsentrasi fenolik yang sama. Ekstrak yang memiliki nilai persen penghambatan yang lebih besar menunjukkan potensinya sebagai penghambat  $\alpha$ -glukosidase yang lebih baik karena mampu menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase lebih besar. Nilai persen penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dihitung berdasarkan penurunan konsentrasi glukosa hasil reaksi hidrolisis maltosa oleh  $\alpha$ -glukosidase dengan menggunakan persamaan 3.1. Konsentrasi glukosa ditentukan dengan menggunakan reaksi *coupling* enzim (lihat Poin 2.8.8). Konsentrasi glukosa sebanding dengan konsentrasi *quinoneimine* yang merupakan produk akhir reaksi *coupling* enzim yang berwarna pink. Warna pink dari *quinoneimine* memiliki panjang gelombang maksimum 500 nm. Penurunan konsentrasi glukosa ketika ditambahkan inhibitor dalam ekstrak akan menyebabkan penurunan absorbansinya pada panjang gelombang tersebut. Semakin kuat inhibitor menghambat  $\alpha$ -glukosidase maka penurunan nilai absorbansinya akan semakin besar karena konsentrasi glukosa yang dihasilkan semakin kecil. Persen penghambatan  $\alpha$ -glukosidase ekstrak Bidara upas dan Kayu kuning dihitung pada Lampiran 12.

##### a. Persen Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase oleh Ekstrak Daun Bidara Upas

Hasil perhitungan persen penghambatan  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak Bidara upas ditampilkan pada Gambar 4.22.



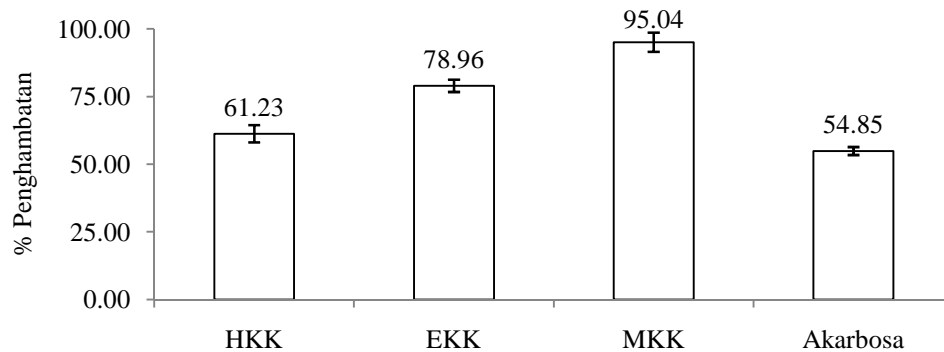
Gambar 4.22 Persen penghambatan  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak Bidara upas

Potensi ekstrak Bidara upas sebagai penghambat  $\alpha$ -glukosidase menurun seiring dengan kenaikan kepolaran pelarut yang digunakan untuk mengekstraknya. Ekstrak MBU yang bersifat paling polar dan memiliki total flavonoid tertinggi menghambat  $\alpha$ -glukosidase terendah. Hal ini menunjukkan bahwa kenaikan kepolaran senyawa fenolik dan total flavonoid ekstrak Bidara upas tidak mendukung potensinya sebagai penghambat  $\alpha$ -glukosidase. Ekstrak HBU yang memiliki kepolaran terendah dan total flavonoid diantara EBU dan MBU menghambat  $\alpha$ -glukosidase tertinggi. Aktivitas penghambatan HBU pada  $\alpha$ -glukosidase di atas akarbosa. Ekstrak HBU mampu menghambat  $66.19 \pm 0.41\%$  aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada konsentrasi  $25 \mu\text{g AGE/ml}$  sedangkan akarbosa menghambat  $54,85 \pm 1,48\%$ . Ekstrak EBU dan MBU memiliki aktivitas penghambatan yang lebih lemah dari akarbosa karena memiliki nilai persen penghambatan yang lebih rendah dari akarbosa.

#### b. Persen Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase oleh Ekstrak Daun Kayu Kuning

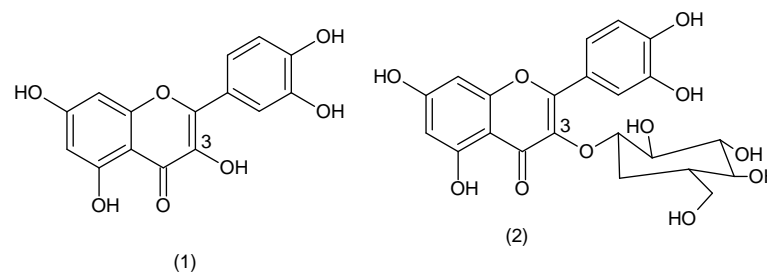
Hasil perhitungan persen penghambatan  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak Kayu kuning ditampilkan pada Gambar 4.23.





Gambar 4.23 Persen penghambatan  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak Kayu kuning

Kepolaran dan total flavonoid mendukung potensi ekstrak Kayu kuning sebagai penghambat  $\alpha$ -glukosidase. Ekstrak MKK yang memiliki kepolaran dan total flavonoid tertinggi juga menghambat  $\alpha$ -glukosidase tertinggi. Ekstrak MKK mampu menghambat  $95,04 \pm 3,55\%$  aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada konsentrasi  $25 \mu\text{g AGE/ml}$  sedangkan akarbosa hanya menghambat  $54,85 \pm 1,48\%$ . Ekstrak HKK dan EKK juga menghambat  $\alpha$ -glukosidase lebih kuat dari akarbosa karena persen penghambatannya lebih tinggi. Menurut Li *et al.* (2009), substitusi gugus hidroksil pada kuersetin dengan satu gugus glikosil pada C3 menjadi isokuersetin menyebabkan kenaikan polaritas dan ukuran molekul. Isokuersetin memiliki aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase yang lebih baik dari kuersetin. Gambar 4.24 merupakan struktur kuersetin dan isokuersetin. Keberadaan senyawa flavonoid polar seperti isokuersetin dalam metanol dapat menyebabkan aktifitas penghambatannya pada  $\alpha$ -glukosidase tinggi.



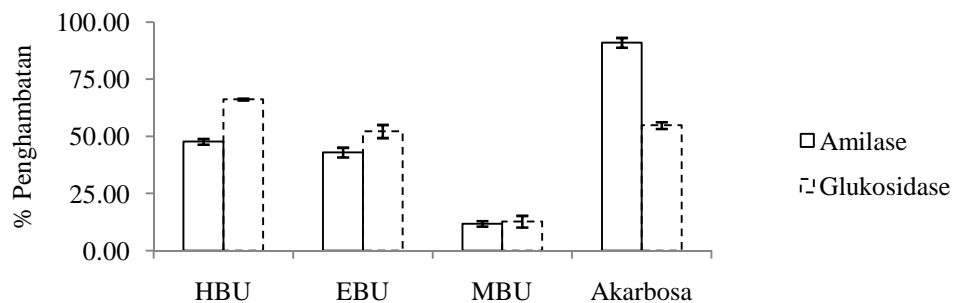
Gambar 4.24 Struktur kuersetin (1) dan isokuersetin (2) (Li *et al.*, 2009)

#### 4.7.3 Perbandingan Persen Penghambatan $\alpha$ -Amilase dan $\alpha$ -Glukosidase oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas dan Kayu Kuning

Ekstrak fenolik Bidara upas dan Kayu kuning yang paling berpotensi sebagai antidiabetik dipilih berdasarkan kemampuannya dalam menghambat  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase. Satu ekstrak yang akan dipilih sebagai ekstrak yang paling berpotensi dari total 6 ekstrak untuk dianalisis kinetika penghambatannya. Penghambatan kedua enzim tersebut lebih baik dalam pengobatan diabetes melitus daripada hanya menghambat salah satunya sehingga keduanya digunakan untuk mempertimbangkan pemilihan ekstrak yang paling berpotensi. Pada konsentrasi 25  $\mu$ g AGE/ml persen penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase dibandingkan.

##### a. Perbandingan Persen Penghambatan $\alpha$ -Amilase dan $\alpha$ -Glukosidase oleh Ekstrak Fenolik Daun Bidara Upas

Hasil perbandingan penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak Bidara upas ditampilkan pada Gambar 4.25.



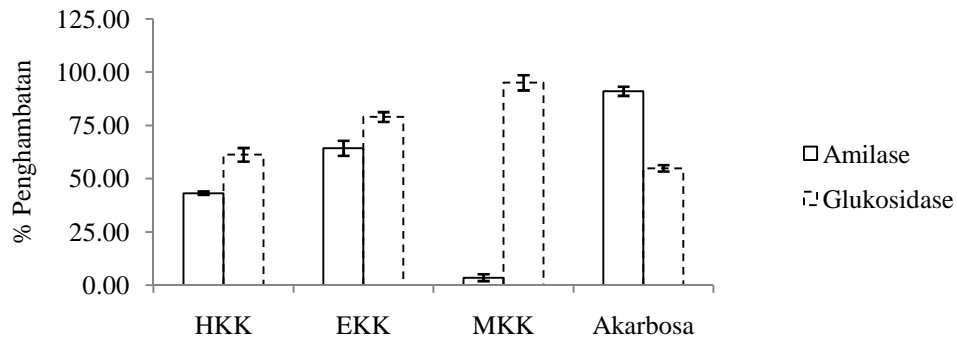
Gambar 4.25 Perbandingan persen penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak Bidara upas

Ekstrak fenolik Bidara upas lebih kuat menghambat  $\alpha$ -glukosidase dari  $\alpha$ -amilase. Akarbose sebagai standar positifnya menunjukkan hal yang sebaliknya. Menurut Liu *et al.* (2013), nilai  $IC_{50}$  akarbose pada  $\alpha$ -amilase  $0,47 \pm 0,0034$  mg/ml sedangkan pada  $\alpha$ -glukosidase dari yeast adalah  $0,69 \pm 0,0047$  mg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa akarbose lebih aktif menghambat  $\alpha$ -amilase dari  $\alpha$ -glukosidase. Ekstrak HBU

menghambat  $\alpha$ -amilase tertinggi dibanding EBU dan MBU tetapi masih dibawah akarbosa. Ekstrak HBU dan EBU menghambat  $\alpha$ -glukosidase lebih tinggi dari akarbosa. Ekstrak HBU menghambat  $\alpha$ -glukosidase tertinggi dibanding EBU dan MBU.

b. Perbandingan Persen Penghambatan  $\alpha$ -Amilase dan  $\alpha$ -Glukosidase oleh Ekstrak Fenolik Daun Kayu Kuning

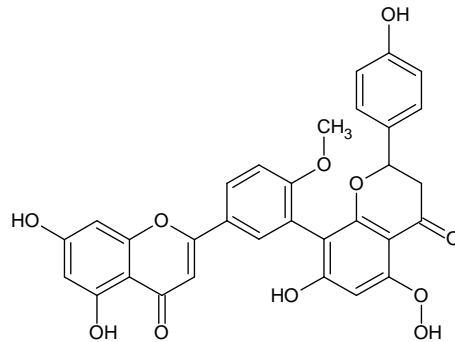
Hasil perbandingan penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak Kayu kuning ditampilkan pada Gambar 4.26.



Gambar 4.26 Perbandingan persen penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak Bidara upas

Ekstrak fenolik Kayu kuning juga lebih kuat menghambat  $\alpha$ -glukosidase dari  $\alpha$ -amilase. Ekstrak MKK memiliki aktivitas penghambatan yang tinggi pada  $\alpha$ -glukosidase tetapi sangat rendah pada  $\alpha$ -amilase. Menurut Kim *et al.* (2000), senyawa biflavon seperti bilobetin aktif menghambat  $\alpha$ -glukosidase tetapi tidak pada  $\alpha$ -amilase. Struktur bilobetin ditunjukkan oleh gambar 4.27. Keberadaan senyawa fenolik seperti bilobetin dalam MKK mungkin menjadi penyebab aktivitas penghambatannya tinggi pada  $\alpha$ -glukosidase tetapi rendah pada  $\alpha$ -amilase. Ekstrak EKK menghambat  $\alpha$ -amilase tertinggi dibanding HKK dan MKK tetapi masih dibawah akarbosa. Ekstrak HKK, EKK, dan MKK menghambat  $\alpha$ -glukosidase lebih

tinggi dibanding akarbosa. Ekstrak MKK menghambat  $\alpha$ -glukosidase tertinggi dibanding HKK dan EKK.



Gambar 4.27 Struktur bilobetin (Kim *et al.*, 2000)

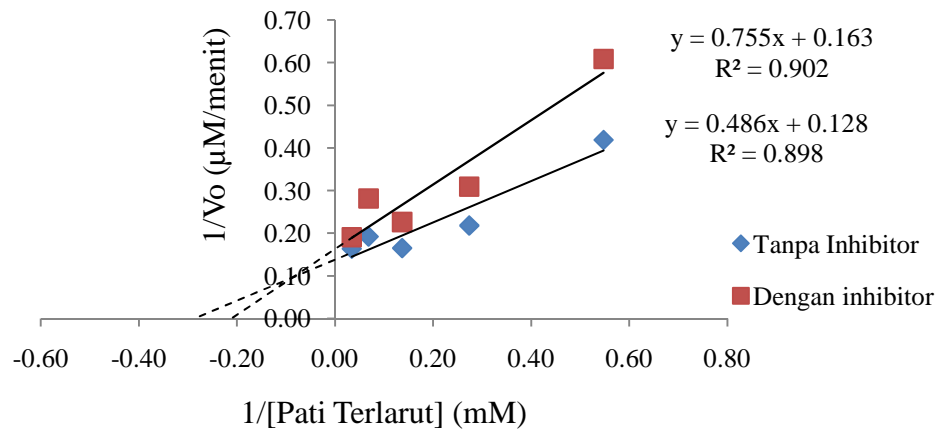
Ekstrak EKK dipilih sebagai ekstrak yang paling berpotensi sebagai antidiabetik. Ekstrak EKK menghambat  $\alpha$ -amilase tertinggi dibanding HKK, MKK, HBU, EBU, dan MBU dan  $\alpha$ -glukosidase tertinggi kedua setelah MKK. Ekstrak MKK tidak dipilih sebagai ekstrak yang paling berpotensi meskipun persen penghambatannya pada  $\alpha$ -glukosidase tertinggi dibanding semua ekstrak karena aktivitasnya dalam menghambat  $\alpha$ -amilase sangat rendah. Kromatogram KLT (lihat Gambar 4.9) menunjukkan bahwa ekstrak EKK memiliki 3 *spot* sedangkan MKK 5 *spot* sehingga ekstrak EKK lebih berpotensi dibandingkan MKK dengan asumsi bahwa setiap *spot* dalam kromatogram menyumbangkan aktivitas penghambatan. Kedua alasan ini yang mendukung ekstrak EKK dipilih sebagai ekstrak yang paling berpotensi sebagai antidiabetik.

#### 4.7.4 Kinetika Penghambatan $\alpha$ -Amilase dan $\alpha$ -Glukosidase oleh Ekstrak Etil Asetat Kayu Kuning (EKK)

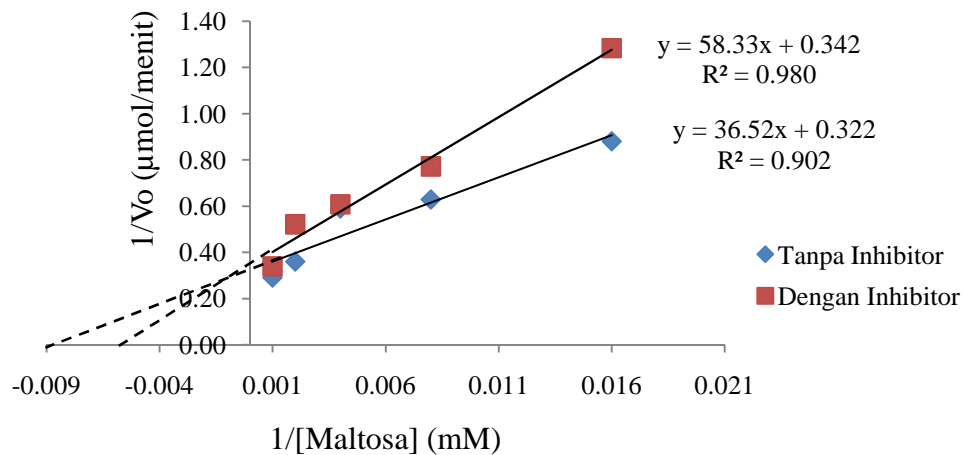
Mekanisme senyawa aktif EKK dalam menghambat  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase dianalisis dengan kinetika penghambatannya. Nilai konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan kecepatan reaksi maksimum ( $V_{Max}$ ) dihitung dari persamaan Lineweaver Burk (lihat Persamaan 3.3). Persamaan tersebut dihasilkan dari

pengeplotan antara  $1/[\text{substrat}]$  melawan  $1/\text{kecepatan awalnya } (V_0)$  sebagaimana ditunjukkan oleh gambar 2.22. Nilai  $K_M$  dan  $V_{\text{Max}}$  digunakan untuk mengklasifikasikan tipe penghambatan enzim. Nilai  $K_M$  menunjukkan afinitas enzim yang dilihat dari besarnya konsentrasi substrat yang dibutuhkan untuk mencapai setengah dari kecepatan reaksi maksimum. Nilai  $K_M$  yang kecil menunjukkan afinitas enzim yang besar karena dengan konsentrasi substrat yang kecil sudah bisa mencapai setengah dari kecepatan maksimum reaksi.

Data awal yang berupa absorbansi dari masing-masing waktu inkubasi diubah menjadi konsentrasi produk reaksi menggunakan persamaan kurva standar untuk menentukan nilai  $V_0$ . Nilai  $V_0$  sama dengan kemiringan dari kurva yang dibentuk antara waktu inkubasi dan konsentrasi produk yang dihasilkan (lihat Gambar 3.1 dan 3.1). Kurva standar maltosa dibuat dengan mengukur absorbansi larutan yang mengandung maltosa dengan konsentrasi yang berbeda pada panjang gelombang 540 nm. Maltosa merupakan salah satu produk reaksi hidrolisis pati terlarut oleh  $\alpha$ -amilase. Panjang gelombang tersebut merupakan panjang gelombang maksimum dari 3-amino-5-nitrosalisilat yang merupakan produk reaksi antara DNS dengan gula reduksi (lihat Gambar 2.37). Kurva standar maltosa dan perhitungan nilai  $V_0$  reaksi hidrolisis  $\alpha$ -amilase ditampilkan pada Lampiran 13. Kurva standar glukosa yang merupakan produk reaksi hidrolisis maltosa oleh  $\alpha$ -glukosidase dibuat melalui pengeplotan antara konsentrasi glukosa yang divariasikan dengan absorbansinya pada 500 nm. Panjang gelombang tersebut merupakan panjang gelombang maksimum dari *quinoneimine* yang merupakan produk reaksi antara glukosa dengan *coupling* enzim (lihat Gambar 2.40 dan 2.43). Kurva standar glukosa dan perhitungan nilai  $V_0$  reaksi hidrolisis maltosa oleh  $\alpha$ -glukosidase ditunjukkan pada Lampiran 14. Nilai  $V_0$  pada masing-masing konsentrasi substrat digunakan untuk membuat kurva Lineweaver Burk. Kurva Lineweaver Burk  $\alpha$ -amilase ditunjukkan oleh Gambar 4.28 dan  $\alpha$ -glukosidase ditunjukkan oleh Gambar 4.29.



Gambar 4.28 Kurva Lineweaver Burk -amilase



Gambar 4.29 Kurva Lineweaver Burk -glukosidase

Titik potong antara sampel yang ditambah inhibitor dan kontrol (tanpa inhibitor) berada disebelah kiri sumbu y dan atas sumbu x. Tipe penghambatan yang memiliki karakter seperti ini adalah reversibel yang campuran (nonkompetitif).

Larutan kontrol dalam tipe penghambatan campuran memiliki nilai konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) yang lebih kecil dari larutan yang ditambahkan inhibitor sedangkan kecepatan reaksi maksimumnya ( $V_{max}$ ) lebih kecil. Perhitungan nilai  $K_M$

dan  $V_{\max}$  -amilase dan -glukosidase ditampilkan dalam Lampiran 15. Hasil perhitungannya ditampilkan dalam Tabel 4.3.

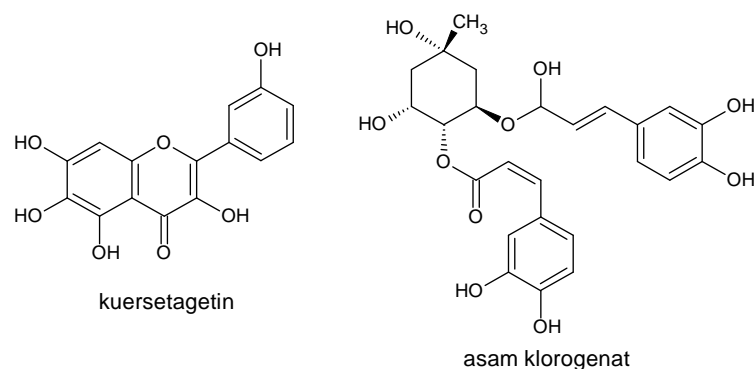
Tabel 4.3 Nilai  $K_M$  dan  $V_{\max}$  -amilase dan -glukosidase

	-Amilase		-Glukosidase	
	Kontrol	Inhibitor	Kontrol	Inhibitor
$V_{\max}$ ( $\mu\text{M}/\text{menit}$ )	7,84 $\pm$ 0,29	6.17 $\pm$ 0,29	3,12 $\pm$ 0,28	2,93 $\pm$ 0,20
$K_M$ (mM)	3,81 $\pm$ 0,011	4,66 $\pm$ 0,47	114,24 $\pm$ 15,69	170,90 $\pm$ 10,28

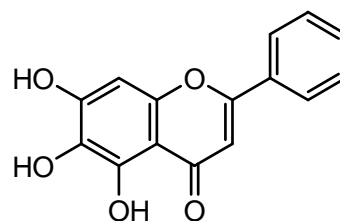
Tipe penghambatan campuran disebabkan oleh kombinasi dari tipe penghambatan kompetitif dan unkompetitif. Tipe penghambatan kompetitif menyebabkan kenaikan nilai  $K_M$  dibandingkan kontrolnya sedangkan tipe penghambatan unkompetitif menyebabkan penurunan nilai  $V_{\max}$  dibanding kontrolnya. Kenaikan nilai  $K_M$  setelah ditambah inhibitor kompetitif menunjukkan penurunan afinitas enzim. Afinitas enzim menurun karena inhibitor dan substrat berkompetisi untuk mendapatkan sisi aktif enzim. Terbentuknya kompleks enzim-inhibitor (EI) menyebabkan substrat tidak dapat terikat ke enzim sehingga produk tidak dihasilkan. Hal ini yang menyebabkan konsentrasi yang dibutuhkan untuk mencapai setengah dari kecepatan maksimum reaksi ( $K_M$ ) meningkat. Penghambat unkompetitif menurunkan kecepatan maksimum reaksi sebab inhibitor mengompleks dengan enzim disisi lain selain tempat substrat terikat. Kompleks enzim inhibitor dapat dibentuk setelah substrat terikat ke enzim sehingga kecepatan reaksi maksimum menurun.

Tipe penghambatan campuran pada -amilase dan -glukosidase oleh ekstrak EKK mungkin disebabkan karena senyawa aktif dalam ekstrak lebih dari satu sehingga mekanisme penghambatan yang berbeda. Ekstrak EKK memiliki 3 senyawa fenolik (lihat Tabel 4.2). Menurut Piparo *et al.* (2008), senyawa flavonoid seperti kuersetagetin dapat membentuk ikatan hidrogen dengan residu katalitik -amilase (lihat Gambar 2.38). Terbentuknya sistem terkonjugasi dari ikatan tersebut menyebabkan interaksi yang stabil dengan enzim. Senyawa flavonoid jenis ini menghambat -amilase secara kompetitif sedangkan tanin seperti asam isoklorogenat

dapat menghambat  $\alpha$ -amilase secara unkompetitif. Keberadaan kedua senyawa tersebut dalam ekstrak dapat menyebabkan tipe penghambatan campuran yaitu kompetitif dan unkompetitif. Menurut Kandra *et al.* (2004), interaksi antara tanin dengan  $\alpha$ -amilase berhubungan dengan gugus hidroksil tanin. Gugus hidroksil tanin mampu mengendapkan  $\alpha$ -amilase melalui ikatan hidrogen. Gambar 4.30 merupakan struktur kuersetagetin dan asam isoklorogenat yang telah terbukti menghambat  $\alpha$ -amilase. Menurut Tadera *et al.* (2006),  $\alpha$ -gluksoidase dapat dihambat oleh senyawa flavonoid yang memiliki cincin C tidak jenuh, 3-OH, 4-CO, dan substituen hidroksil pada cincin B. Menurut Gao & Kawabata (2004), senyawa flavonoid dengan struktur dasar 5,6,7-trihidroksiflavinon (Gambar 4.31) merupakan syarat penting untuk aktivitasnya sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase. Adanya substituent hidroksil pada cincin B dari struktur tersebut lebih meningkatkan kemampuannya dalam menghambat  $\alpha$ -glukosidase.



Gambar 4.30 Struktur inhibitor  $\alpha$ -amilase (Sales *et al.*, 2012)



5,6,7-trihidroksiflavinon

Gambar 4.31 Struktur inhibitor  $\alpha$ -glukosidase (Gao & Kawabata, 2004)



## **BAB 5. PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

1. Ekstrak fenolik daun Bidara upas dan Kayu kuning berpotensi sebagai antioksidan dibandingkan dengan standar vitamin C. Ekstrak MBU meredam aktivitas radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil tertinggi dibandingkan ekstrak HBU dan EBU. Ekstrak MKK meredam aktivitas radikal DPPH dan hidroksil tertinggi dibandingkan ekstrak HKK dan EKK sedangkan ekstrak EKK meredam aktivitas radikal anion superoksida tertinggi dibandingkan ekstrak HKK dan MKK.
2. Ekstrak HBU, EBU, HKK, dan EKK berpotensi sebagai antidiabetik dibandingkan dengan standar akar bosa sedangkan ekstrak MBU dan MKK tidak berpotensi. Ekstrak EKK paling berpotensi sebagai antidiabetik dibandingkan ekstrak HBU, EBU, MBU, HKK, dan MKK karena memiliki aktivitas penghambatan yang tinggi pada  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase.
3. Senyawa aktif dalam ekstrak EKK menghambat  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase secara campuran (kompetitif dan unkompetitif).

### **5.2 Saran**

1. Ekstrak MBU meredam radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil tertinggi untuk sampel Bidara upas sehingga perlu dilakukan identifikasi dan isolasi senyawa aktifnya.
2. Ekstrak MKK meredam radikal DPPH dan hidroksil tertinggi serta menghambat  $\alpha$ -glukosidase tertinggi untuk sampel Kayu kuning sehingga perlu dilakukan identifikasi dan isolasi senyawa aktifnya.
3. Ekstrak EKK paling berpotensi sebagai antidiabetik karena memiliki aktivitas penghambatan yang tinggi pada  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase sehingga perlu dilakukan identifikasi dan isolasi senyawa aktifnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- American Diabetes Association. 2010. Position statement: Standards of Medical Care in Diabetes 2010. *Diabetes Care*, 1: 33.
- Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucic, B., & Trinajstic, N. 2007. SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, 14: 827-845.
- Andrade, R. J., Lucena, M., Vega, J. L., Torres, M., Salmeron, F. J., Bellot, V., Garcia-Escano, M. D., Moreno, P. 1998. Acarbose-Associated Hepatotoxicity. *Diabetes Care*, 21 (11): 2029-2030.
- Balai Taman Nasional Meru Betiri. 2014. *Letak Taman Nasional Meru Betiri*. [http://merubetiri.com/detail\\_statis/id/41/lebih\\_lebih.html](http://merubetiri.com/detail_statis/id/41/lebih_lebih.html) [21 November 2014].
- Balai Taman Nasional Meru Betiri. 2014. *Potensi Flora Taman Nasional Meru Betiri*. [http://merubetiri.com/detail\\_statis/id/18/potensi\\_flora.html](http://merubetiri.com/detail_statis/id/18/potensi_flora.html) [21 November 2014].
- Balitbangkes. 2013. *Riset Kesehatan Dasar*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Bankar, S. B., Blue, M. V., Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. 2009. Glucose oxidase-An overview. *Biotechnology Advances*, 27: 489–501.
- Biesaga, M & Pyrzynska, K. 2013. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chem*, 136: 46–54.
- Bubols, G. B., Vianna, D. D. R., Medina-Rejon, A., Poser, G. V., Lamuela-Ravantos, R., Eifler-Lima, V., & Gracia, S. C. 2013. The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13: 000-000.
- Chandran, P., Vysakhi, M.V., Manju, S., Kannan, M., Kader, Z., & Nair, S. 2013. *In Vitro* Free Radical Scavenging Activity of Aqueous and Methanolic Leaf Extracts of *Aegle Tamilnadensis* Abdul Kader (Rutaceae). *Int J Pharm Pharm Sci*, 5 (3): 819-823.

- Chang, W. C., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Park, S. H., & Kim, S. K. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal Plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci*, 163: 1161-1168.
- Ciesla, L., Karyszen, J., Stochmal, A., Oleszek, W., & Waksumundzka-Hajnos, M. 2012. Approach to develop a standardized TLC-DPPH• test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70: 126-135.
- Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation. 2014. *Sketsa Merremia mammosa*. [http://web3.dnp.go.th/botany/Botany\\_Eng/illus\\_Eng3.html](http://web3.dnp.go.th/botany/Botany_Eng/illus_Eng3.html) [22 Desember 2014].
- Dewick, P. M. 2002. *Medical Natural Product: A Biosynthetic Approach*. Second Edition. England: John Willey & Sons Ltd.
- Ernest, H. A., Leggio, L. L., Willemoës, M., Leonard, G., Blum, P., & Larsen, S. 2006. Structure of the Sulfolobus Solfataricus Alpha-Glucosidase: Implications for Domain Conservation and Substrate Recognition in GH31. *Journal of Molecular Biology*, 358 (4): 1106-1124.
- Feng, J., Yang, X-V., & Wang, R-F. 2011. Bio-assay guided isolation and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aquilaria sinensis*. *Phytochemistry*, 72: 242-247.
- Gao, H & Kawabata, J. 2004. Importance of the B ring and its substitution on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of baicalein, 5, 6, 7-trihydroxyflavone. *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 68: 1858-1864.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Phenolic compound extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15: 8813-8826.
- Gray, G. M., Lally, B. C., & Conklin, K. A. 1979. Action of Intestinal Sucrase-Isomaltase and Its Free Monomers on an  $\alpha$ -Limit Dextrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 254 (13): 6038-6043.
- Gutteridge, J. M. C & Halliwell, B. 1988. The deoxyribose assay: an assay both for 'free' hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. *BJ Letters*, 253: 932-933.
- Guigliano, D., Ceriello, A., & Paolisso, G. 1996. Oxidatif Stress and Diabetic Vascular Complication. *Diabetes Care*, 19 (3): 257-267.

- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., & Arouma, O. I. 1987. The deoxyribose method: a simple test tube assay for the determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem*, 165: 215-219.
- Harborne, J. B. *Metode Fitokimia*. Alih bahasa oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. 1987. Bandung: Penerbit ITB.
- Harvey, D. 2000. *Modern Analytic Chemistry*. New York: McGraw-Hill.
- Hashim, A., Khan, M. S., Khan, M. S., Baig, M. H., & Ahmad, S. 2013. Antioxidant and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Property of *Phyllanthus virgatus* L.: An *In Vitro* and Molecular Interaction Study. *BioMed Research International*, 2013.
- Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., & Wang, J. 2009. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems *in vitro*. *Food Chem*, 114: 1147–1154.
- Hunt, J. V., Dean, R. T., & Wolf, S. P. 1988. Hydroxyl radical production and autooxidative glycation. *Biochem. J*, 256: 205-212.
- Hyun, T. K., Kim, M. O., Lee, H., Kim, Y., Kim, E., & Kim, J. S. 2013. Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax morbifera* Léveillé. *Food Chem*, 141: 1947–1955.
- ICS-UNIDO. 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology.
- International Diabetes Federation. 2003. *Diabetes Atlas*. Second Edition. Belgium: Imprimerie L Vanmelle SA, Gent/Mariakerke.
- Istvan, E. 2003. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atherosclerosis Supplements*, 4: 3-8.
- Janecek, S. 2009. Amylolytic Enzymes-Focus on the  $\alpha$ -Amylase from Archaea and Plants. *Nova Biotechnologica*, 9-1.
- Jewvachdamrongkul, Y., Jirawattanapong, W., & Ayudhya, T. D. N. 1993. Quality Control Study of *Arcangelisia flava* Steam. *Bull. Dept. Med. Sci*, 35 (4): 227-243.
- Kalpanadevi, V & Mohan, V. R. 2012. *In vitro* antioxidant studies of *Begonia malabarica* Lam. and *Begonia floccifera* Bedd. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1572-1577.

- Kancheva, V. D., Boranova, P. V., Nechev, J. T., & Monolov, I. I. 2010. Structure activity relationships of new 4-hydroxy bis-coumarins as radical scavengers and chain-breaking antioxidants. *Biochimie*, 92: 1138-1146.
- Kandra, L., Gyémánt, G., Zajác, A., & Battab, G. Inhibitory effects of tannin on human salivary  $\alpha$ -amylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 319: 1265-1271.
- Katherine H. S., Peter C. E., Moody & Emma L. R. 2003. A new framework for understanding substrate binding and functional diversity in haem peroxidases. *Dalton Trans*, 4208-4215.
- Keawpradub, N., Dej-adisai, S., & Yoenyongsawad, S. 2005. Antioxidant and cytotoxic activities of Thai medicinal plants named Khaminkhruea: *Arcangelisia flava*, *Coscinium blumeianum* and *Fibraurea tinctoria*. *J. Sci. Technol*, 27 (2): 455-467.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18: 2328-2375.
- Kim, J. S., Kwon, C. S., & Son, K. H. 2000. Inhibition of Alpha-glucosidase and Amylases by Luteolin, a Flavonoid. *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 64 (11): 2458-2461.
- Lehninger, A. L. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid 1. Alih bahasa oleh Thenawidjaja. 1988. Jakarta: Erlangga.
- Li, X., Lin, J., Gao, Y., Han, W., & Chen, D. 2012. Antioxidant activity and mechanism of *Rhizoma Cimicifugae*. *Chemistry Central Journal*, 6: 140.
- Li, Y. Q., Zhou, F. C., Gao, F., Bian, J. S., & Shan, F. 2009. Evaluation of Quercetin, Isoquercetin and Rutin as Inhibitors of  $\alpha$ -Glucosidase. *Agric. Food Chem*, 57: 11463-11468.
- Liu, S., Li, D., Huang, B., Chen, Y., Lu, X., & Wang Y. 2013. Inhibition of pancreatic lipase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase, and hypolipidemic effects of the total flavonoids from *Nelumbo nucifera* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Mandia, E. H., Ridsdale, C. E., Horsten, S. F. A. J., & Aguinaldo, A. M. 1999. *Arcangelisia flava* L. Merr. In Plant Resource of South-East Asia. *Backhyus Publisher, Leinden*, 12 (1): 129-132.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins, J. B. 2003. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *J Biochem Molecular Toxicology*, 17 (1): 24-37.

- Miyazawa, M., Yagi, N., & Taguchi, K. 2005. Inhibitory Compounds of  $\alpha$ -Glucosidase Activity from *Arctium lappa* L. *J. Oleo Sci*, 54 (11): 589-594.
- Nakamura, S., Takahira, K., Tanabe, G., Muraoka, O., & Nakanishi, I. 2012. Homology Modeling of Human Alpha-Glucosidase Catalytic Domains and SAR Study of Salacinol Derivatives. *Open Journal of Medicinal Chemistry*, 2: 50-60.
- Nanheesha, M. K. F., Bamunuarachichi, A., Edirisinghe, E. M. R. K. B. M., & Weerasinghe W. M. S. K. 2007. Study on Antioxidant Activity of Indian Gooseberry Fruit and Seed. *J. Sci*, 3: 83-92.
- Nelson, D. L & Cox, M. M. 2004. *Principles of Biochemistry*. Forth Edition. New York: W.H. Publisher.
- Nimse, S. B & Pal, D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv*, 5: 27986.
- Pardo, G. D., Arozarena., Inigo., & Arroyo, M. R. M. 2011. Stability of polyphenolic extracts from grape seeds after thermal treatments. *Eur. Food. Res. Technol*, 232: 211–220.
- Patel, D. K., Kumar, R., & Hemalatha, D. L. 2012. Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 239-250.
- Perkeni. 2010. *Onsensus Pengendalian dan Pencegahan Diabetes Mellitus Tipe2 di Indonesia 2011*. Jakarta: Perkeni press.
- Piparo, L. E., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Grigorov, M., & Chou, C. J. 2008. Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human  $\alpha$ -Amylase. *J. Med. Chem*, 5: 3555-3561.
- Plantamor. 2012. *Bidara upas (Merremia mammosa)*. <http://www.plantamor.com/index.php?plant=840> [22 Desember 2014].
- Plantamor. 2012. *Kayu Kuning (Arcangelisia flava)*. <http://www.plantamor.com/index.php?plant=126> [22 Desember 2014].
- Ramuan Jamu Nusantara dan Pengobatan. 2014. *Bidara Upas (Merremia mammosa)*. <http://www.jamunusantara.com/bidara-upas-merremia-mammosa/> [21 November 2014].

- Rayner, C. M & Raynel, G. R. J. F. 2011. *Process for the capture of carbon dioxide*. <http://www.google.com/patents/WO2011135378A1?cl=en> [5 mei 2015].
- Sales, P. M. D., Souza, P. M. D., Simeoni, L. A., Magalhaes, P. D. O., & Silveria, D. 2012. -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 15(1): 141-183.
- Sarker, S. D & Nahar, L. 2007. *Chemistry for Pharmacy Students: General, Organic and Natural Product Chemistry*. England: John Willey & Sons Ltd.
- Shabeer, J., Srivatava, R. S., & Singh, S, K. 2009. Antidiabetic and antioxidant effect of various fractions of *Phyllanthus simplex* in alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 124: 34–38.
- Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Hu, B., Kumar, S., Placido, J., & Zito, S. W. 2008. a-Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto–Kakizaki (GK) rats. *J. Carbohydrate Research*, 343: 1278–1281.
- Shulman, G. I. 2000. Cellular Mechanisms of Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106: 2.
- Shutterstock. 2014. *Structure of human insulin*. <http://www.shutterstock.com/pic-115340302/stock-photo-structure-of-human-insulin.html> [15 Desember 2014].
- Singapore Botanic Gardens. 2011. *Descriptions of Merremia mammosa*. <http://convolvulaceae.myspecies.info/taxonomy/term/7361/descriptions> [22 Desember 2014].
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., & Wichers, H. J. 2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of food stuffs. *Phytochem. Anal*, 11: 330–338.
- Subeki., Matsuura, H., Takahashi, K., Yamasaki, M., Yamato, O., Maeda, Y., Katakura, K., Suzuki, M., Trimuningsih., Chairul., & Yoshihara, T. 2004. Antibabasal Activity of Protoberberine Alkaloids and 20-Hydroxyecdysone from *Arcangelisia flava* against *Babesia gibsoni* in Culture. *J. Vet. Med. Sci*, 67 (2): 223-227.
- Sudha, S. S., Karthic, R., Naveen., & Rengarmanujam, J. 2011. Anti hyperlipidemic activity of *Spirulina platensis* in Triton x-100 induced hyperlipidemic rats. *Journal For Drugs and Medicines*, 3 (2): 32-37.

- Swamy, N., Prashanth, K. N., & Basavaish, K. 2014. Redox-Reaction Based Spectrophotometric Assay of Isoniazid in Pharmaceuticals. *ISRN Analytical Chemistry*.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuoka, T. 2006. Inhibition of  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase by Flavonoids. *J. Nutr. Sci*, 52: 149–153.
- Taga, M. S., Miller, E. E., & Prat, D. E. 1984. Chia seeds as a source of nature lipid antioxidants. *J. Am. Oil. Chem. Soc*, 61: 928-931.
- Tang, X., He, Z., Day, Y., Xiong, Y.L., Xie, M., & Chen, J. 2010. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem*, 58: 587-593.
- Tauber, H. 1953. *Oxidation of Pyrogallol to Purpuro by Crystalline Catalase*. California: Chapel Hill.
- Timerman, A. P. Tanpa Tahun. *The Isolation of Invertase from Baker's Yeast – An Introduction to Protein Purification Strategies*. USA: University of Wisconsin-Stevens Point.
- Vinodu, M.V & Padmanabhan, M. 2001. Peroxidase-like catalytic activities of ionic metalloporphyrins supported on functionalised polystyrene surface. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, 113 (1): 1–9.
- Wade, L. G. 2006. *Organic Chemistry*. Sixth Edition. United States of America: Pearson Prentice Hall.
- Wang, J., Yue, Y. D., Tang, F., & Sun, J. 2012. TLC Screening for Antioxidant Activity of Extracts from Fifteen Bamboo Species and Identification of Antioxidant Flavone Glycosides from Leaves of *Bambusa. Textilis* McClure. *Molecules*, 17: 12297-12311.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Wolff, S. P. 1993. Diabetes mellitus and free radicals: Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *British Medical Bulletin*, 49 (3): 642-432.
- You, Q., Chen, F., Wang, X., Jiang, Y., & Lin, S. 2011. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Science and Technology*, 46: 164-168.



Zhu, H., Wang, Y. Z., Liu, Y. X. & Xia, Y. L. 2009. Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Analytical Methods*, 3: 2.

## LAMPIRAN

## 1. Validasi Tanaman Kayu Kuning dan Bidara Upas



**KEMENTERIAN KEHUTANAN**  
**DIREKTORAT JENDERAL PERLINDUNGAN HUTAN DAN KONSERVASI ALAM**  
**BALAI TAMAN NASIONAL MERU BETIRI**  
 Jl. Sriwijaya 53 Kotak Pos 269 Jember 68101 Telp/Fax. +62331335535  
 email : admin@merubetiri.com Website :www.merubetiri.com

**BERITA ACARA PEMERIKSAAN PENGAMBILAN SAMPEL TUMBUHAN**

Nomor : BA. 1271 /BTNMB-1/2015

-----Pada hari ini Rabu, tanggal Dua Puluh bulan Mei tahun Dua ribu Lima Belas, berdasarkan SIMAKSI Nomor : SI.2513/BTNMB-1/2014 tanggal 8 Oktober 2014 dan Surat Ketua Tim Peneliti Center for Development of Advanced Sciences and Technology (CDAST) Universitas Jember Nomor : 093/UN25/TU/CDAST/2015 tanggal 6 Mei 2015 yang bertanda tangan di bawah ini -----



1. N a m a /NIP : Nur Rohmah Syarif S.Si. MP. / 197209051999032001-----  
 Pangkat / Gol. : Penata Tk I / (III/d) -----  
 Jabatan : PEH Muda -----
2. N a m a /NIP : Iva Tri Lindsari / 198310222002122002-----  
 Pangkat / Gol. : Pengatur Tk. I / (II/d) -----  
 Jabatan : PEH Pelaksana Lanjutan -----

Dengan ini telah melakukan pemeriksaan sampel tumbuhan untuk keperluan penelitian oleh Tim Peneliti CDAST-UNEJ (Dosen dan Mahasiswa) Universitas Jember, dengan hasil pemeriksaan sebagai berikut :

No.	Nama / Jenis	Jumlah (sampel)	Keterangan
1.	Sampel Tumbuhan Kayu Kuning ( <i>Arcangelisia flava</i> )	1 kg	-
2.	Sampel Tumbuhan Bidara Upas ( <i>Merremia mammosa</i> )	1 kg	-
3.	Sampel Tumbuhan Wuni ( <i>Antidesma bunius</i> )	1 kg	-
4.	Sampel Tumbuhan Garu ( <i>Antidesma montanum</i> )	1 kg	-
5.	Sampel Tumbuhan Maitan ( <i>Lunasia amara Blanco</i> )	1 kg	-
6.	Sampel Tumbuhan Ketangi ( <i>Lagerstromea speciosa</i> )	1 kg	-
7.	Sampel Tumbuhan Sintok ( <i>Cinnamomum sintoc</i> )	1 kg	-
8.	Sampel Tumbuhan Girang ( <i>Leea indica</i> )	1 kg	-
9.	Sampel Tumbuhan Kragean ( <i>Leea rubra</i> )	1 kg	-
10.	Sampel Tumbuhan Kemuning ( <i>Murraya paniculata</i> )	1 kg	-
11.	Sampel Tumbuhan Timo ( <i>Kleinhovia haspita</i> )	1 kg	-
12.	Sampel Tumbuhan Jati Belanda ( <i>Guazuma tomentosa</i> )	1 kg	-
13.	Sampel Tumbuhan Kepuh ( <i>Sterculia foetida</i> )	1 kg	-
14.	Sampel Tumbuhan Bayur ( <i>Pterospermum javanicum</i> )	1 kg	-
	Jumlah	14 kg	


Sampel tumbuhan tersebut benar-benar telah diperiksa dan diangkut ke kampus Universitas Jember untuk kepentingan penelitian di Kampus Universitas Jember. -----

Yang diperiksa,  
 Pemohon,  
  
 Zuliyati

Jember, 20 Mei 2015  
 Yang memeriksa,  
 1. Nur Rohmah Syarif S.Si MP  
 NIP. 197209051999032001 (  )  
 2. Iva Tri Lindsari  
 NIP. 198310222002122002 (  )



Mengetahui,  
 a.n. Kepala Balai TN. Meru Betiri  
 Kepala Sub Bagian Tata Usaha

  
 Sulistrianto S.Si M.Si  
 NIP. 196805101995031002

## 2. Warna Ekstrak Bidara Upas dan Kayu Kuning



## 3. Perhitungan Rendemen Maserasi

$$\% \text{ Rendemen} = \left( \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Simplisia}} \right) \times 100\%$$

Nama Ekstrak	Berat Ekstrak (g)	Berat Simplisia (g)	% Rendemen
HBU	1.64	50	3.28
EBU	2.52	47.89	5.26
MBU	7.73	45.14	17.1
HKK	1.38	50	2.76
EKK	2.12	48.03	4.41
MKK	7.7	45.37	17.0

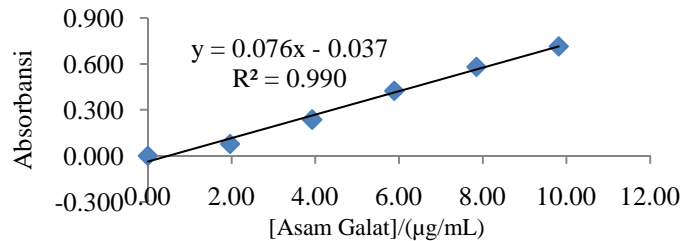
## 4. Konsentrasi Ekstrak untuk Analisis Total Fenolik dan Flavonoid

$$[\text{Ekstrak}] = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Volume Metanol}}$$

Nama Ekstrak	Berat Ekstrak (mg)	Volume Metanol (ml)	[Ekstrak]
HBU	10.13	10	1.01
EBU	3.36	5	0.672
MBU	5.64	5	1.13
HKK	10.72	10	1.07
EKK	3.75	5	0.750
MKK	10.55	5	2.11

## 5. Kurva Standar Asam Galat dan Total Fenolik Ekstrak

### 5.1 Kurva Standar Asam Galat



### 5.2 Total Fenolik Ekstrak

$$y = 0.076x - 0.037$$

$$x_1 = \frac{\text{Abs.} + 0,037}{0,076} \longrightarrow \sim\text{g AGE/mL}$$

$$x_2 = x_1 \times \text{FP} \longrightarrow \sim\text{g AGE/mL}$$

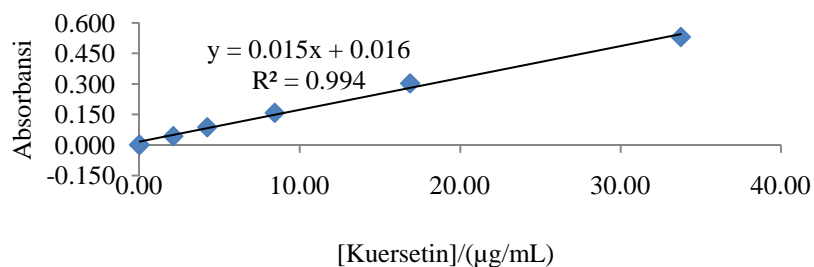
$$x_3 = \frac{x_2}{[\text{Ekstrak}]} \longrightarrow \text{mg AGE/g}$$

$$[\text{Fenolik}] \longrightarrow \text{mg GAE/g}$$

Ekstrak	Abs.	$x_1$	FP	$x_2$	$x_3$	[Fenolik]
MBU	0.506	7.14	55	392.96	347.75	359.92±10.77
	0.531	7.47	55	411.05	363.76	
	0.538	7.57	55	416.12	368.25	
EBU	0.248	3.75	27.5	103.13	153.46	157.05±3.11
	0.258	3.88	27.5	106.74	158.84	
	0.258	3.88	27.5	106.74	158.84	
HBU	0.046	1.09	22	24.03	23.79	23.12±0.92
	0.045	1.08	22	23.74	23.50	
	0.040	1.01	22	22.29	22.07	
MKK	0.339	4.95	55	272.11	128.96	135.25±6.02
	0.374	5.41	55	297.43	140.96	
	0.359	5.21	55	286.58	135.82	
EKK	0.190	2.99	27.5	82.14	109.52	114.99±4.83
	0.205	3.18	27.5	87.57	116.75	
	0.209	3.24	27.5	89.01	118.68	
HKK	0.049	1.13	22	24.89	23.27	23.36±0.68
	0.047	1.11	22	24.32	22.73	
	0.052	1.17	22	25.76	24.08	

## 6. Kurva Standar Kuersetin dan Total Flavonoid Ekstrak

### 6.1 Kurva Standar Kuersetin



### 6.2 Total Flavonoid Ekstrak

$$y = 0.015x + 0.016, \text{ Abs. A} = \text{Abs.} - \text{Abs. B}$$

$$x_1 = \frac{\text{Abs.} - 0,016}{0,015} \longrightarrow \sim\text{g KE/mL}$$

$$x_2 = x_1 \times \text{FP} \longrightarrow \sim\text{g KE/mL}$$

$$x_3 = \frac{x_2}{[\text{Ekstrak}]} \longrightarrow \text{mg KE/g}, \quad [\text{Flavonoid}] \longrightarrow \text{mg KE/g}$$

Ekstrak	Abs.	Abs. B	Abs. A	$x_1$	FP	$x_2$	$x_3$	[Flavonoid]
MBU	0.248	0.012	0.236	14.7	35	513.33	454.28	449.46±4.30
	0.244	0.012	0.232	14.4	35	504.00	446.02	
	0.245	0.012	0.233	14.5	35	506.33	448.08	
EBU	0.137	0.074	0.063	3.13	35	109.67	163.19	160.88±2.00
	0.136	0.074	0.062	3.07	35	107.33	159.72	
	0.136	0.074	0.062	3.07	35	107.33	159.72	
HBU	0.159	0.048	0.111	6.33	35	221.67	219.47	215.62±6.67
	0.159	0.048	0.111	6.33	35	221.67	219.47	
	0.154	0.048	0.106	6.00	35	210.00	207.92	
MKK	0.295	0.035	0.260	16.3	35	569.33	269.83	267.61±1.92
	0.292	0.035	0.257	16.1	35	562.33	266.51	
	0.292	0.035	0.257	16.1	35	562.33	266.51	
EKK	0.248	0.188	0.060	2.93	35	102.67	136.89	141.04±3.59
	0.250	0.188	0.062	3.07	35	107.33	143.11	
	0.250	0.188	0.062	3.07	35	107.33	143.11	
HKK	0.114	0.071	0.043	1.80	35	63.00	58.88	56.70±3.78
	0.111	0.071	0.040	1.60	35	56.00	52.34	
	0.114	0.071	0.043	1.80	35	63.00	58.88	

7. Nilai *Retardation factor* (Rf) setiap *Spot* Kromatogram KLT

$$Rf = \frac{J. T. Senyawa}{J. T. Pelarut}$$

J. T. Senyawa (cm)	J. T. Pelarut (cm)	Nilai <i>Retardation factor</i>
0.65	8	0.081
0.90	8	0.112
1.15	8	0.144
2.10	8	0.262
2.70	8	0.338
2.80	8	0.35
3.25	8	0.406
4.20	8	0.525
4.45	8	0.556
5.75	8	0.719
6.25	8	0.781
6.85	8	0.856
7.00	8	0.875

8. Nilai  $IC_{50}$  Radikal DPPH

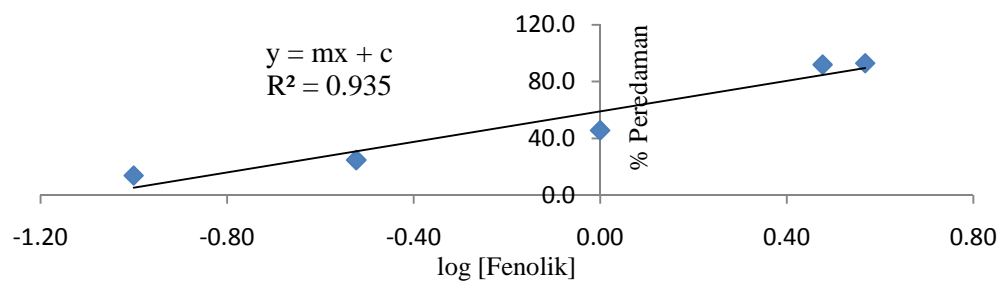
[Fenolik] → ~g GAE/mL

$$\% \text{ Peredaman} = \left( \frac{A_0 - A_s}{A_0} \right) \times 100\%$$

$A_0$  = Abs. → [Fenolik] = 0

$A_s$  = Abs. 0,1 - 3 → [Fenolik] tertentu mulai 0,1 - 3

Kurva peredaman:



$$IC_{50} = 10^{\left( \frac{y-c}{m} \right)}$$

Ekstrak	[Fenolik]	Abs			log [Fenolik]	% Peredaman			y = mx + c			IC <sub>50</sub>
		Abs.1	Abs.2	Abs.3		1	2	3	1	2	3	
MBU	0	0.311	0.311	0.311	0	0	0	0	y = 53.76x + 58.96, R <sup>2</sup> = 0.935			0.696±0.015
	0.1	0.268	0.268	0.269	-1	13.83	13.83	13.5	y = 54.10x + 58.48, R <sup>2</sup> = 0.919			
	0.3	0.234	0.236	0.239	-0.52	24.76	24.12	23.15	y = 54.16x + 58.03, R <sup>2</sup> = 0.920			
	1	0.169	0.178	0.178	0	45.66	42.77	42.77				
	3	0.025	0.024	0.025	0.48	91.96	92.28	91.96				
	3.7	0.022	0.02	0.022	0.57	92.93	93.57	92.93				
MKK	0	0.311	0.311	0.311	0	0	0	0	y = 55.03x + 63.19, R <sup>2</sup> = 0.986			0.576±0.009
	0.1	0.28	0.28	0.272	-1	9.97	9.97	12.54	y = 55.32x + 62.84, R <sup>2</sup> = 0.983			
	0.3	0.221	0.226	0.227	-0.52	28.94	27.33	27.01	y = 54.50x + 63.40, R <sup>2</sup> = 0.979			
	1	0.098	0.098	0.099	0	68.49	68.49	68.17				
	3	0.028	0.029	0.026	0.48	91	90.68	91.64				
	3.7	0.027	0.027	0.026	0.57	91.32	91.32	91.64				
EBU	0	0.311	0.311	0.311	0	0	0	0	y = 52.17x + 57.52, R <sup>2</sup> = 0.938			0.705±0.013
	0.1	0.265	0.27	0.26	-1	14.79	13.18	16.4	y = 53.11x + 58.06, R <sup>2</sup> = 0.947			
	0.3	0.243	0.237	0.23	-0.52	21.86	23.79	26.05	y = 49.96x + 57.95, R <sup>2</sup> = 0.931			
	1	0.165	0.165	0.171	0	46.95	46.95	45.02				
	3	0.043	0.035	0.04	0.48	86.17	88.75	87.14				
	3.7	0.022	0.024	0.027	0.57	92.93	92.28	91.32				
EKK	0	0.311	0.311	0.311	0	0	0	0	y = 35.73x + 53.89, R <sup>2</sup> = 0.829			0.801±0.021
	0.1	0.233	0.234	0.227	-1	25.08	24.76	27.01	y = 37.81x + 53.51, R <sup>2</sup> = 0.842			
	0.3	0.204	0.221	0.223	-0.52	34.41	28.94	28.3	y = 35.94x + 53.14, R <sup>2</sup> = 0.826			
	1	0.199	0.194	0.195	0	36.01	37.62	37.3				
	3	0.084	0.086	0.085	0.48	72.99	72.35	72.67				
	3.7	0.05	0.044	0.052	0.57	83.92	85.85	83.28				
HBU	0	0.311	0.311	0.311	0	0	0	0	y = 42.69x + 44.91, R <sup>2</sup> = 0.790			1.36±0.05
	0.1	0.268	0.261	0.259	-1	13.83	16.08	16.72	y = 42.44x + 44.50, R <sup>2</sup> = 0.799			
	0.3	0.259	0.277	0.283	-0.52	16.72	10.93	9	y = 42.38x + 43.59, R <sup>2</sup> = 0.762			
	1	0.242	0.23	0.24	0	22.19	26.05	22.83				
	3	0.07	0.078	0.077	0.48	77.49	74.92	75.24				
	3.7	0.081	0.08	0.081	0.57	73.95	74.28	73.95				
HKK	0	0.311	0.311	0.311	0	0	0	0	y = 34.20x + 45.00, R <sup>2</sup> = 0.775			1.41±0.02
	0.1	0.245	0.245	0.247	-1	21.22	21.22	20.58	y = 33.80x + 45.03, R <sup>2</sup> = 0.764			
	0.3	0.244	0.241	0.251	-0.52	21.54	22.51	19.29	y = 33.73x + 44.76, R <sup>2</sup> = 0.851			
	1	0.229	0.228	0.208	0	26.37	26.69	33.12				
	3	0.109	0.12	0.115	0.48	64.95	61.41	63.02				
	3.7	0.079	0.071	0.088	0.57	74.6	77.17	71.7				
Vit.c	0	0.311	0.311	0.311	0	0	0	0	y = 52.02x + 52.10, R <sup>2</sup> = 0.904			0.928±0.019

0.1	0.277	0.272	0.267	-1	10.93	12.54	14.15	$y = 50.35x + 51.17, R^2 = 0.889$
0.3	0.258	0.262	0.266	-0.52	17.04	15.76	14.47	$y = 50.48x + 51.70, R^2 = 0.876$
1	0.198	0.201	0.2	0	36.33	35.37	35.69	
3	0.054	0.059	0.053	0.48	82.64	81.03	82.96	
3.7	0.035	0.04	0.04	0.57	88.75	87.14	87.14	

### 9. Persen Peredaman Radikal Anion Superoksida

$$\% \text{ Peredaman} = \left( \frac{\text{Slope blangko} - \text{Slope sampel}}{\text{Slope Blangko}} \right) \times 100\%$$

Ekstrak	<i>Slope</i> sampel	<i>Slope</i> blangko	% Peredaman	% Peredaman
MBU	0.1072	0.1444	25.76	25.44±1.21
	0.1096	0.1444	24.10	
	0.1062	0.1444	26.45	
EBU	0.1153	0.1444	20.15	18.67±1.35
	0.1179	0.1444	18.35	
	0.1191	0.1444	17.52	
HBU	0.1142	0.1444	20.91	20.61±0.84
	0.1137	0.1444	21.26	
	0.116	0.1444	19.67	
MKK	0.1267	0.1444	12.26	12.17±0.11
	0.1268	0.1444	12.19	
	0.127	0.1444	12.05	
EKK	0.1114	0.1444	22.85	22.16±0.73
	0.1135	0.1444	21.40	
	0.1123	0.1444	22.23	
HKK	0.1202	0.1444	16.76	16.74±0.04
	0.1203	0.1444	16.69	
	0.1202	0.1444	16.76	
Vit. C	0.1147	0.1444	20.57	20.43±0.57
	0.1158	0.1444	19.81	
	0.1142	0.1444	20.91	



## 10. Persen Peredaman Radikal Hidroksil

$$\% \text{ Peredaman} = \left( \frac{\text{Abs. B} - (\text{Abs. S} - \text{Abs. KS})}{\text{Abs. B}} \right) \times 100\%$$

Ekstrak	Abs. S	Abs. KS	Abs. S- Abs. KS	Abs. B	% Peredaman	% Peredaman
MBU	0.177	0.122	0.055	0.692	92.05	91.76±0.38
	0.178	0.122	0.056	0.692	91.91	
	0.182	0.122	0.06	0.692	91.33	
EBU	0.239	0.130	0.109	0.692	84.25	82.66±2.88
	0.238	0.130	0.108	0.692	84.39	
	0.273	0.130	0.143	0.692	79.34	
HBU	0.546	0.299	0.247	0.692	64.31	64.55±0.22
	0.544	0.299	0.245	0.692	64.60	
	0.543	0.299	0.244	0.692	64.74	
MKK	0.192	0.126	0.066	0.692	90.46	90.51±0.08
	0.191	0.126	0.065	0.692	90.61	
	0.192	0.126	0.066	0.692	90.46	
EKK	0.34	0.146	0.194	0.692	71.97	73.07±0.96
	0.329	0.146	0.183	0.692	73.55	
	0.328	0.146	0.182	0.692	73.70	
HKK	0.516	0.232	0.284	0.692	58.96	59.25±0.25
	0.513	0.232	0.281	0.692	59.39	
	0.513	0.232	0.281	0.692	59.39	
Vit. C	0.183	0.105	0.078	0.692	88.73	88.78±0.08
	0.182	0.105	0.077	0.692	88.87	
	0.183	0.105	0.078	0.692	88.73	

## 11. Persen Penghambatan -Amilase

$$SA = S^+ - S^-$$

$$k = C^+ - C^-$$

$$\% \text{ Penghambatan} = \left[ \frac{k - SA}{k} \right] \times 100\%$$

	C <sup>+</sup>	C <sup>-</sup>	k	k (rata-rata)			
	0.605	0.366	0.239	0.222			
	0.591	0.371	0.22				
	0.584	0.377	0.207				

Sampel	S <sup>+</sup>	S <sup>-</sup>	SA	k	k - SA	% Penghambatan	% Penghambatan
Akarbosa	0.393	0.375	0.018	0.222	0.202	91.818	91.06±2.15
	0.4	0.375	0.025	0.222	0.195	88.636	
	0.391	0.375	0.016	0.222	0.204	92.727	
MBU	0.604	0.411	0.193	0.222	0.027	12.273	11.82±1.20
	0.603	0.411	0.192	0.222	0.028	12.727	
	0.608	0.411	0.197	0.222	0.023	10.455	
MKK	0.594	0.385	0.209	0.222	0.011	5.000	3.48±1.60
	0.597	0.385	0.212	0.222	0.008	3.636	
	0.601	0.385	0.216	0.222	0.004	1.818	
EBU	0.52	0.4	0.120	0.222	0.100	45.455	43.03±2.15
	0.527	0.4	0.127	0.222	0.093	42.273	
	0.529	0.4	0.129	0.222	0.091	41.364	
EKK	0.475	0.394	0.081	0.222	0.139	63.182	64.24±3.53
	0.464	0.394	0.070	0.222	0.150	68.182	
	0.479	0.394	0.085	0.222	0.135	61.364	
HBU	0.495	0.378	0.117	0.222	0.103	46.818	47.73±1.20
	0.494	0.378	0.116	0.222	0.104	47.273	
	0.49	0.378	0.112	0.222	0.108	49.091	
HKK	0.509	0.383	0.126	0.222	0.094	42.727	43.18±0.79
	0.509	0.383	0.126	0.222	0.094	42.727	
	0.506	0.383	0.123	0.22	0.097	44.091	

## 12. Persen Penghambatan -Glukosidase

$$SA = S^+ - S^-$$

$$k = C^+ - C^-$$

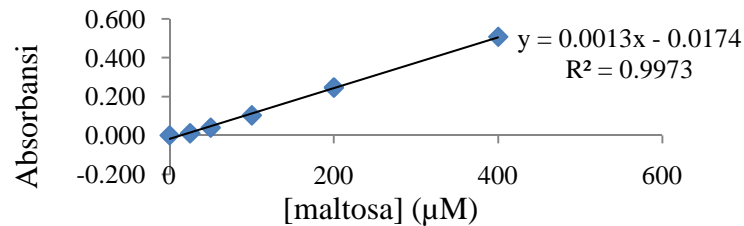
$$\% \text{ Penghambatan} = \left[ \frac{k - SA}{k} \right] \times 100\%$$

C <sup>+</sup>	C <sup>-</sup>	k	k (rata-rata)
0.834	0.691	0.143	0.141
0.838	0.691	0.147	
0.823	0.691	0.132	

Sampel	S <sup>+</sup>	S <sup>-</sup>	SA	k	k - SA	% Penghambatan	% Penghambatan
Akarbosa	0.807	0.744	0.063	0.141	0.078	55.319	54.85±1.48
	0.806	0.744	0.062	0.141	0.079	56.028	
	0.81	0.744	0.066	0.141	0.075	53.191	
MBU	0.754	0.632	0.122	0.141	0.019	13.475	12.77±2.56
	0.759	0.632	0.127	0.141	0.014	9.929	
	0.752	0.632	0.120	0.141	0.021	14.894	
MKK	0.714	0.707	0.007	0.141	0.134	95.035	95.04±3.55
	0.719	0.707	0.012	0.141	0.129	91.489	
	0.709	0.707	0.002	0.141	0.139	98.582	
EBU	0.73	0.659	0.071	0.141	0.070	49.645	52.25±2.87
	0.722	0.659	0.063	0.141	0.078	55.319	
	0.727	0.659	0.068	0.141	0.073	51.773	
EKK	0.688	0.657	0.031	0.141	0.110	78.014	78.96±2.28
	0.689	0.657	0.032	0.141	0.109	77.305	
	0.683	0.657	0.026	0.141	0.115	81.560	
HBU	0.79	0.743	0.047	0.141	0.094	66.667	66.19±0.41
	0.791	0.743	0.048	0.141	0.093	65.957	
	0.791	0.743	0.048	0.141	0.093	65.957	
HKK	0.747	0.692	0.055	0.141	0.086	60.993	61.23±3.20
	0.742	0.692	0.050	0.141	0.091	64.539	
	0.751	0.692	0.059	0.141	0.082	58.156	

### 13. Kurva Standar Maltosa dan Nilai $V_0$ -Amilase

#### 13.1 Kurva Standar Maltosa



#### 13.2 Nilai $V_0$ Reaksi Hidrolisis -Amilase

$$V_0 = m \rightarrow y = mx + c, \quad V_0 \rightarrow \frac{\sim M}{\text{menit}}$$

##### Kinetika ke 1

[PT] (mM)	TI ( $y = mx + c$ )	DI ( $y = mx + c$ )	TI ( $V_0$ )	DI ( $V_0$ )
1.83	$y = 2.490x + 14.19, R^2 = 0.949$	$y = 1.567x + 15.47, R^2 = 0.948$	2.49	1.567
3.65	$y = 4.597x + 19.70, R^2 = 0.933$	$y = 3.269x + 19.78, R^2 = 0.934$	4.597	3.269
7.30	$y = 6.044x + 12.83, R^2 = 0.903$	$y = 4.368x + 12.75, R^2 = 0.833$	6.044	4.368
14.61	$y = 5.155x + 15.88, R^2 = 0.974$	$y = 3.608x + 7.945, R^2 = 0.939$	5.155	3.608
29.21	$y = 6.089x + 8.906, R^2 = 0.899$	$y = 5.155x + 8.302, R^2 = 0.797$	6.089	5.155

##### Kinetika ke 2

[PT] (mM)	TI ( $y = mx + c$ )	DI ( $y = mx + c$ )	TI ( $V_0$ )	DI ( $V_0$ )
1.83	$y = 2.278x + 13.60, R^2 = 0.939$	$y = 1.714x + 15.39, R^2 = 0.973$	2.278	1.714
3.65	$y = 4.661x + 20.00, R^2 = 0.933$	$y = 3.296x + 18.87, R^2 = 0.943$	4.661	3.296
7.30	$y = 6.172x + 12.34, R^2 = 0.893$	$y = 4.487x + 12.56, R^2 = 0.808$	6.172	4.487
14.61	$y = 5.018x + 13.49, R^2 = 0.995$	$y = 3.717x + 7.065, R^2 = 0.914$	5.018	3.717
29.21	$y = 6.025x + 11.57, R^2 = 0.934$	$y = 5.338x + 9.620, R^2 = 0.818$	6.025	5.338

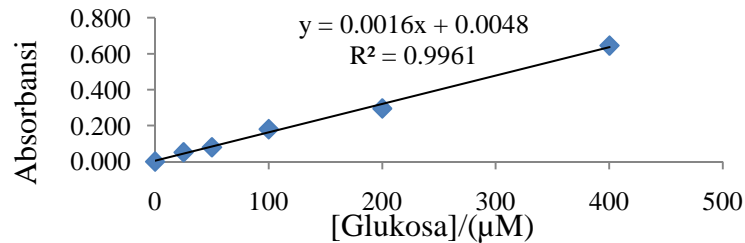
##### Kinetika ke 3

[PT] (mM)	TI ( $y = mx + c$ )	DI ( $y = mx + c$ )	TI ( $V_0$ )	DI ( $V_0$ )
1.83	$y = 2.410x + 13.64, R^2 = 0.922$	$y = 1.655x + 16.60, R^2 = 0.938$	2.41	1.655
3.65	$y = 4.523x + 21.13, R^2 = 0.931$	$y = 3.141x + 19.73, R^2 = 0.959$	4.523	3.141
7.3	$y = 5.998x + 13.13, R^2 = 0.894$	$y = 4.395x + 12.61, R^2 = 0.828$	5.998	4.395
14.61	$y = 5.494x + 14.70, R^2 = 0.993$	$y = 3.351x + 10.69, R^2 = 0.934$	5.494	3.351
29.21	$y = 6.245x + 11.35, R^2 = 0.912$	$y = 5.228x + 12.47, R^2 = 0.817$	6.245	5.228

Keterangan: PT = pati terlarut, TI = larutan tanpa inhibitor, DI = larutan yang ditambah inhibitor, dan  $V_0$  = kecepatan awal reaksi

## 14. Kurva Standar Glukosa dan Nilai $V_0$ Reaksi Hidrolisis -Glukosidase

### 14.1 Kurva Standar Glukosa



### 14.2 Nilai $V_0$ Reaksi Hidrolisis -Glukosidase

$$V_0 = m \rightarrow y = mx + c, \quad V_0 \rightarrow \frac{\sim M}{\text{menit}}$$

Kinetika ke 1.

[Maltosa] (mM)	TI (y = mx + c)	DI (y = mx + c)	TI ( $V_0$ )	DI ( $V_0$ )
0.0625	y = 1.130x - 12.515, R <sup>2</sup> = 0.852	y = 0.810x + 6.806, R <sup>2</sup> = 0.824	1.13	0.81
0.125	y = 1.641x + 15.000, R <sup>2</sup> = 0.742	y = 1.331x - 5.990, R <sup>2</sup> = 0.880	1.641	1.331
0.25	y = 1.788x + 9.625, R <sup>2</sup> = 0.857	y = 1.771x - 6.500, R <sup>2</sup> = 0.965	1.788	1.771
0.5	y = 2.854x - 27.625, R <sup>2</sup> = 0.816	y = 2.029x + 9.625, R <sup>2</sup> = 0.898	2.854	2.029
1	y = 3.771x - 25.250, R <sup>2</sup> = 0.884	y = 3.195x - 18.750, R <sup>2</sup> = 0.873	3.771	3.195

Kinetika ke 2

[Maltosa] (mM)	TI (y = mx + c)	DI (y = mx + c)	TI ( $V_0$ )	DI ( $V_0$ )
0.0625	y = 1.134x - 12.488, R <sup>2</sup> = 0.851	y = 0.807x + 5.529, R <sup>2</sup> = 0.847	1.134	0.807
0.125	y = 1.652x + 14.500, R <sup>2</sup> = 0.757	y = 1.253x - 5.570, R <sup>2</sup> = 0.826	1.652	1.253
0.25	y = 1.661x + 9.500, R <sup>2</sup> = 0.816	y = 1.554x - 3.625, R <sup>2</sup> = 0.940	1.661	1.554
0.5	y = 2.798x - 28.375, R <sup>2</sup> = 0.810	y = 2.005x + 10.500, R <sup>2</sup> = 0.871	2.798	2.005
1	y = 3.596x - 26.875, R <sup>2</sup> = 0.837	y = 3.079x - 11.250, R <sup>2</sup> = 0.945	3.596	3.079

Kinetika ke 3

[Maltosa] (mM)	TI (y = mx + c)	DI (y = mx + c)	TI ( $V_0$ )	DI ( $V_0$ )
0.0625	y = 1.147x - 12.574, R <sup>2</sup> = 0.849	y = 0.727x + 4.963, R <sup>2</sup> = 0.809	1.147	0.727
0.125	y = 1.496x + 13.625, R <sup>2</sup> = 0.739	y = 1.308x - 6.874, R <sup>2</sup> = 0.851	1.496	1.308
0.25	y = 1.648x + 9.875, R <sup>2</sup> = 0.815	y = 1.629x - 5.875, R <sup>2</sup> = 0.938	1.648	1.629
0.5	y = 2.707x - 27.875, R <sup>2</sup> = 0.804	y = 1.754x + 13.500, R <sup>2</sup> = 0.886	2.707	1.754
1	y = 3.050x - 17.000, R <sup>2</sup> = 0.906	y = 2.648x - 13.875, R <sup>2</sup> = 0.890	3.05	2.648

Keterangan: TI = larutan tanpa inhibitor, DI = larutan yang ditambah inhibitor, dan

$V_0$  = kecepatan awal reaksi

15. Nilai  $K_M$  dan  $V_{max}$  -Amilase dan -Glukosidase

$$V_{max} = \frac{1}{c} \rightarrow y = mx + c$$

$$V_{max} \rightarrow \sim M/\text{menit}$$

$$K_M = m \times V_{max} \rightarrow \text{mM}$$

Enzim	Lineveaver-Burk ( $y = mx + c$ )		KM (mM)		Vmax ( $\mu\text{M}/\text{menit}$ )	
	TI	DI	TI	DI	TI	DI
-Amilase	$y = 38.22x + 0.296,$ $R^2 = 0.923$	$y = 57.2x + 0.316,$ $R^2 = 0.983$	3.38	5.19	7.52	6.41
	$y = 36.69x + 0.317,$ $R^2 = 0.883$	$y = 56.32x + 0.351,$ $R^2 = 0.973$	4.10	4.50	7.94	6.25
	$y = 34.64x + 0.354,$ $R^2 = 0.888$	$y = 61.47x + 0.359,$ $R^2 = 0.968$	3.95	4.30	8.06	5.85
			114.24 $\pm$ 1.69	170.90 $\pm$ 10.28	3.12 $\pm$ 0.28	2.93 $\pm$ 0.20
-Glukosidase	$y = 0.450x + 0.133,$ $R^2 = 0.898$	$y = 0.810x + 0.156,$ $R^2 = 0.901$	129.12	181.01	3.38	3.16
	$y = 0.516x + 0.126,$ $R^2 = 0.871$	$y = 0.720x + 0.160,$ $R^2 = 0.913$	115.74	160.46	3.15	2.85
	$y = 0.490x + 0.124,$ $R^2 = 0.924$	$y = 0.735x + 0.171,$ $R^2 = 0.889$	97.85	171.23	2.82	2.79
			3.81 $\pm$ 0.011	4.66 $\pm$ 0.47	7.84 $\pm$ 0.29	6.17 $\pm$ 0.29

Keterangan: TI = larutan tanpa inhibitor, DI = larutan yang ditambah inhibitor, dan  $V_{max}$  = kecepatan maksimum reaksi, dan  $K_M$  = Konstanta Michaelis-Menten