



**STUDI AKTIVITAS EKSTRAK DAUN BUNGUR (*Lagerstroemia speciosa*)
DAN MAITAN (*Lunasia amara* Blanco) SEBAGAI ANTIOKSIDAN
SERTA INHIBITOR α -AMILASE DAN α -GLUKOSIDASE**

SKRIPSI

Oleh

Jainur Rochman

NIM 111810301052

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2015



**STUDI AKTIVITAS EKSTRAK DAUN BUNGUR (*Lagerstroemia speciosa*)
DAN MAITAN (*Lunasia amara* Blanco) SEBAGAI ANTIOKSIDAN
SERTA INHIBITOR α -AMILASE DAN α -GLUKOSIDASE**

SKRIPSI

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

Oleh

Jainur Rochman

NIM 111810301052

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. keluarga tercinta, Ibunda Siti Mu'awanah, Ayahanda M. Jatim, Bapak H. Jaini, nenek tercinta Bariyah, serta kedua kakakku M. Yasin dan Irma Yanti;
2. kelarga Bapak Sutarman dan Ibu Susini Dwi Susiharini serta sahabat terbaik Muh. Abdillah Akbar yang menjadi keluarga kedua saya;
3. guru dan dosen sejak taman kanak-kanak hingga di perguruan tinggi;
4. kawan seperjuangan KIMIA 2011 (SOLVENT), keluarga besar Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, serta almamater Universitas Jember.

MOTO

Ilmu pengetahuan itu pahit pada awalnya, tetapi manis melebihi madu pada akhirnya.^{*)}

Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap.
(terjemahan Surat *Al-Insyirah* ayat 5-8).^{**)}

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

***) Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. *Al-Quran dan Terjemahannya*. Bandung: CV. Diponegoro.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Jainur Rochman

NIM : 111810301052

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Studi Aktivitas Ekstrak Daun Bungur (*Lagerstroemia speciosa*) dan Maitan (*Lunasia amara* Blanco) sebagai Antioksidan serta Inhibitor α -Amilase dan α -Glukosidase” 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, 1 November 2015

Yang menyatakan,

Jainur Rochman

NIM 111810303052

SKRIPSI

**STUDI AKTIVITAS EKSTRAK DAUN BUNGUR (*Lagerstroemia speciosa*)
DAN MAITAN (*Lunasia amara* Blanco) SEBAGAI ANTIOKSIDAN
SERTA INHIBITOR α -AMILASE DAN α -GLUKOSIDASE**

Oleh

Jainur Rochman

NIM 111810301052

Pembimbing

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Studi Aktivitas Ekstrak Daun Bungur (*Lagerstroemia speciosa*) dan Maitan (*Lunasia amara* Blanco) sebagai Antioksidan serta Inhibitor α -Amilase dan α -Glukosidase” 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. 197012251997022001

Prof. Tri Agus Siswoyo, S.P., M.Agr., Ph.D
NIP. 197008101998031001

Penguji I,

Penguji II,

drh. Wuryanti Handayani, M.Si
NIP. 196008221985032002

Drs. Achmad Sjaifullah M.Sc., Ph.D
NIP. 196310121987021001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Jember

Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D
NIP. 196101081986021001

RINGKASAN

Studi Aktivitas Ekstrak Daun Bungur (*Lagerstroemia speciosa*) dan Maitan (*Lunasia amara* Blanco) sebagai Antioksidan serta Inhibitor α -Amilase dan α -Glukosidase; Jainur Rochman, 111810301052; 2015: 90 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Bungur (*Lagerstroemia speciosa*) dan Maitan (*Lunasia amara* Blanco) adalah tanaman yang dilaporkan memiliki kandungan senyawa fenolik. Fenolik merupakan salah satu kelompok besar senyawa metabolit sekunder yang umumnya dijumpai pada tanaman tingkat tinggi. Kelompok senyawa ini menarik banyak perhatian pada beberapa tahun terakhir karena potensinya sebagai antioksidan dan efeknya dalam mencegah berbagai penyakit degeneratif. Selain memiliki aktivitas sebagai antioksidan, beberapa anggota senyawa fenolik juga dilaporkan memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim. Antioksidan adalah senyawa yang dapat menunda atau memperlambat, menghambat, atau mencegah proses oksidasi terhadap suatu molekul target melalui peredaman radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif, sedangkan inhibitor enzim adalah senyawa yang dapat menghambat aktivitas enzim.

Salah satu penyakit degeneratif yang secara global prevalensinya cukup tinggi adalah Diabetes Melitus (DM). Kombinasi antioksidan dan inhibitor α -amilase dan α -glukosidase merupakan langkah efektif dalam terapi pengobatan DM. Obat antidiabetik seperti akarbose yang merupakan inhibitor sintetik α -amilase dan α -glukosidase memiliki efek samping pada gastrointestinal, sedangkan antioksidan sintetik seperti butil hidroksianisol bersifat karsinogenik. Kondisi ini menyebabkan banyak usaha dilakukan saat ini untuk mencari inhibitor dan antioksidan alami yang berasal dari bahan alam. Oleh sebab itu, pada penelitian ini dilakukan studi aktivitas ekstrak daun Bungur dan Maitan sebagai antioksidan serta inhibitor α -amilase dan α -glukosidase.

Aktivitas ekstrak daun Bungur dan Maitan sebagai antioksidan dianalisis melalui uji peredaman radikal DPPH, radikal anion superoksida, dan radikal hidroksil. Radikal DPPH digunakan untuk melihat aktivitas ekstrak sebagai antioksidan secara umum, sedangkan untuk melihat aktivitas antioksidan yang lebih spesifik menggunakan radikal anion superoksida dan radikal hidroksil. Aktivitas ekstrak dalam meredam ketiga jenis radikal tersebut pada konsentrasi yang sama dibandingkan untuk menentukan ekstrak yang paling aktif sebagai antioksidan. Vitamin C digunakan sebagai standar dalam analisis antioksidan.

Aktivitas ekstrak daun Bungur dan Maitan sebagai inhibitor enzim dianalisis melalui uji inhibisi α -amilase dan α -glukosidase. Ekstrak yang memiliki persen penghambatan tertinggi pada α -amilase dan α -glukosidase pada konsentrasi yang sama dianggap sebagai ekstrak yang paling aktif sebagai inhibitor. Akarbosa digunakan sebagai standar dalam analisis inhibisi α -amilase dan α -glukosidase. Mekanisme penghambatan α -amilase dan α -glukosidase oleh ekstrak yang paling aktif sebagai inhibitor dipelajari dari kinetika penghambatannya.

Hasil analisis antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak daun Bungur dan Maitan memiliki aktivitas yang cukup tinggi sebagai antioksidan dibandingkan dengan standar vitamin C. Ekstrak metanol Bungur (MB) menunjukkan aktivitas tertinggi dalam meredam radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil dibanding ekstrak heksana Bungur (HB) dan etil asetat Bungur (EB). Ekstrak etil asetat Maitan (EM) menunjukkan aktivitas tertinggi dalam meredam radikal DPPH dan anion superoksida dibanding ekstrak heksana Maitan (HM) dan metanol Maitan (MM), sedangkan ekstrak MM mampu meredam radikal Hidroksil lebih kuat dari ekstrak HM dan EM. Hasil analisis inhibisi enzim menunjukkan ekstrak MB dan MM memiliki aktivitas yang tinggi sebagai inhibitor α -amilase dan α -glukosidase dibandingkan standar akarbosa. Ekstrak MB terpilih sebagai ekstrak teraktif sebagai inhibitor karena memiliki aktivitas penghambatan tertinggi pada α -amilase dan α -glukosidase dibanding semua ekstrak. Senyawa aktif dalam ekstrak MB menghambat α -amilase dan α -glukosidase secara kompetitif.

PRAKATA

Puji syukur atas segala rahmat dan karunia yang dilimpahkan Allah SWT, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Ekstrak Fenolik Daun Bungur (*Lagerstroemia speciosa*) dan Maitan (*Lunasia amara* Blanco) sebagai Antioksidan serta Inhibitor α -Amilase dan α -Glukosidase”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di 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, S.P., M.Agr., Ph.D, selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
4. drh. Wuryanti Handayani, M.Si, selaku Dosen Penguji I sekaligus Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa, dan Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D, selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktunya guna menguji, serta memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
5. segenap dosen pengajar Fakultas MIPA, terutama dosen-dosen Jurusan Kimia Universitas Jember yang telah memberikan banyak ilmu dan pengetahuan;
6. keluarga tercinta, Ibunda Siti Mu’awanah, Ayahanda M. Jatim, Bapak H. Jaini, nenek tercinta Bariyah, serta kedua kakakku M. Yasin dan Irma Yanti, yang setia

mendukung baik moril dan materiil, mendoakan, mendidik, dan memberi kasih sayang dan pengorbanan yang tidak terhingga selama ini;

7. keluarga Bapak Sutarman dan Ibu Susini Dwi Susiharini serta sahabat terbaik Muh. Abdillah Akbar yang menjadi keluarga kedua saya, terimakasih atas doa, dukungan, semangat, bantuan, perhatian serta kasih sayangnya.
8. teman-teman Kimia angkatan 2011 (SOLVENT), terima kasih atas semangat, bantuan, saran, perhatian, dan kenangan yang telah diberikan;
9. sahabat seperjuangan, Lilik Duwi Wahyudi, Putu Irwan Yasa, Rosita Wahyuningrum, Lutfi Septi Aksanantika, Susilowati, Okky Santi, dan Robitha Kartikasari, terima kasih atas doa, dukungan, semangat dan perhatian yang diberikan selama ini;
10. kawan seperjuangan dalam menyelesaikan skripsi di *Center for Development of Advance Science and Technology* (CDAST), terima kasih atas saran, kerjasama dan bantuannya;
11. semua pihak yang telah membantu 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, November 2015

Penulis

DAFTAR ISI

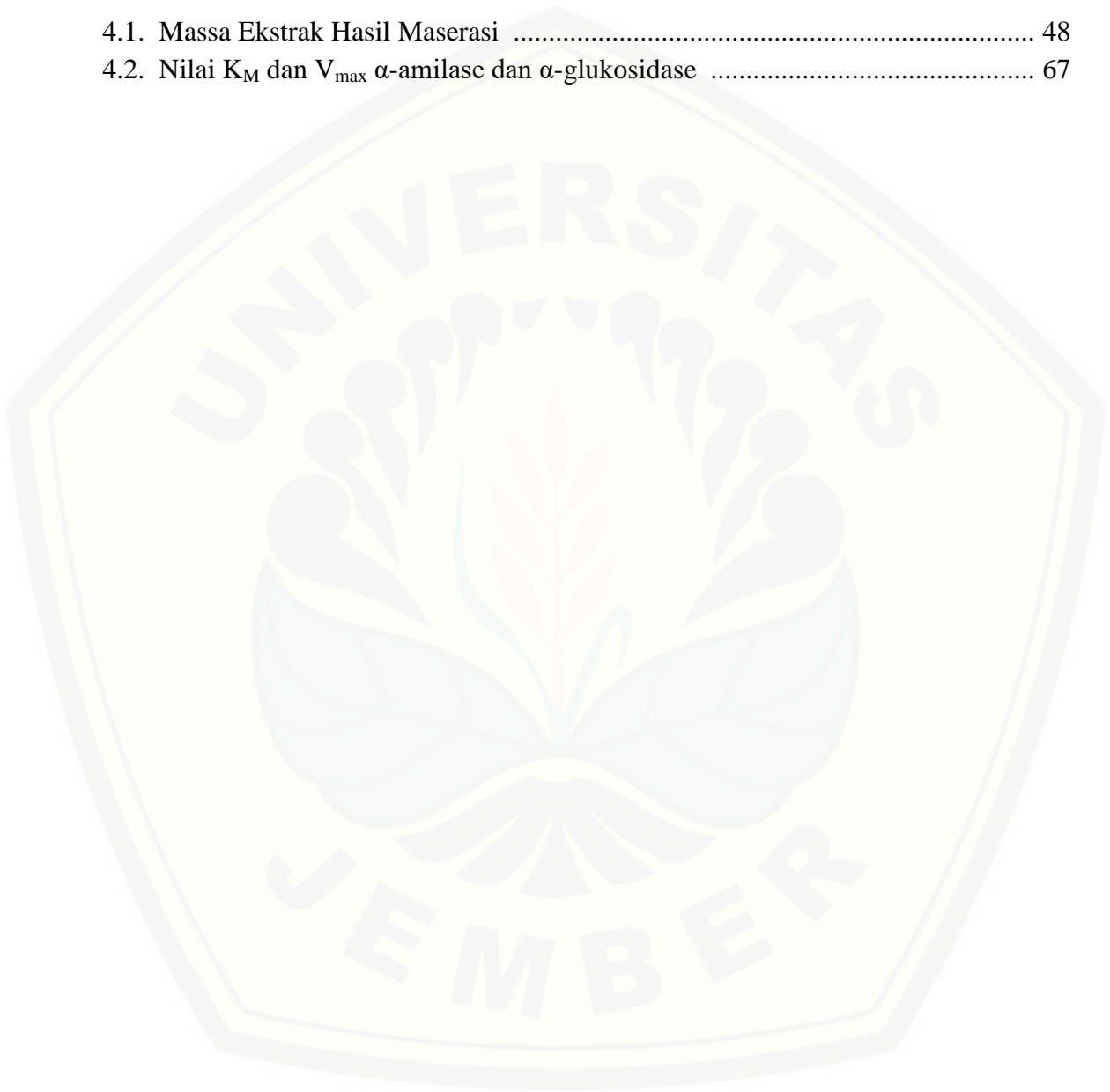
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Taman Nasional Meru Betiri	5
2.2 Bungur (<i>Lagerstroemia speciosa</i>)	5
2.3 Maitan (<i>Lunasia amara</i> Blanco)	8
2.4 Senyawa Bioaktif: Fenolik	10
2.4.1 Fenolik Sederhana	10
2.4.2 Asam Fenolat	11
2.4.3 Kumarin	11
2.4.4 Stilben	12
2.4.5 Flavonoid	12
2.4.6 Lignan, Neolignan, dan Lignin	13
2.4.7 Tanin	15
2.5 Ekstraksi Senyawa Bioaktif	17
2.6 Senyawa Antioksidan	18
2.7 Inhibitor α-Amilase dan α-Glukosidase	21
2.8 Kinetika Inhibisi Enzim	23

2.9 Prinsip Analisis Kandungan Fenolik	26
2.9.1 Analisis Total Fenolik	26
2.9.2 Analisis Total Flavonoid	27
2.10 Prinsip Analisis Antioksidan	28
2.10.1 Analisis Peredaman Radikal DPPH	28
2.10.2 Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida	29
2.10.3 Analisis Peredaman Radikal Hidroksil	30
2.11 Prinsip Analisis Inhibisi Enzim	32
2.11.1 Analisis Inhibisi α -Amilase	32
2.11.2 Analisis Inhibisi α -Glukosidase	34
BAB 3. METODE PENELITIAN	36
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	36
3.2 Alat dan Bahan	36
3.2.1 Alat	36
3.2.2 Bahan	36
3.3 Diagram Alir Penelitian	38
3.4 Prosedur Kerja	39
3.4.1 <i>Sampling</i>	39
3.4.2 Pembuatan Simplisia Daun Bungur dan Maitan	39
3.4.3 Ekstraksi Simplisia Daun Bungur dan Maitan	39
3.4.4 Analisis Total Fenolik Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	40
3.4.5 Analisis Total Flavonoid Ekstrak Daun Bungur dan Maitan ..	40
3.4.6 Uji Aktivitas Antioksidan	41
a. Analisis Peredaman Radikal DPPH oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	41
b. Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	42
c. Analisis Peredaman Radikal Hidroksil oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	42
3.4.7 Uji Aktivitas Inhibitor	43
a. Analisis Inhibisi α -Amilase oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	43
b. Analisis Inhibisi α -Glukosidase oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	43
3.4.8 Uji Kinetika Inhibisi	44
a. Kinetika Inhibisi α -Amilase oleh Ekstrak Teraktif sebagai Inhibitor	44

b. Kinetika Inhibisi α -Glukosidase oleh Ekstrak Teraktif sebagai Inhibitor	45
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	46
4.1 Hasil Maserasi Daun Bungur dan Maitan	47
4.2 Total Fenolik Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	48
4.3 Total Flavonoid Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	50
4.4 Perbandingan Total Fenolik dan Flavonoid Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	52
4.5 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	53
4.5.1 Peredaman Radikal DPPH oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	54
4.5.2 Peredaman Radikal Anion Superoksida oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	55
4.5.3 Peredaman Radikal Hidroksil oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	56
4.5.4 Perbandingan Peredaman Radikal DPPH, Anion Superoksida, dan Hidroksil oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	58
4.6 Aktivitas Inhibitor Enzim Ekstrak Daun Bungur dan Maitan ..	59
4.6.1 Penghambatan α -Amilase oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	60
4.6.2 Penghambatan α -Glukosidase oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	61
4.6.3 Perbandingan Penghambatan α -Amilase dan α -Glukosidase oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan	63
4.6.4 Kinetika Penghambatan α -Amilase dan α -Glukosidase oleh Ekstrak Metanol Bungur	64
BAB 5. PENUTUP	70
5.1 Kesimpulan	70
5.2 Saran	70
DAFTAR PUSTAKA	71
LAMPIRAN	78

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1. Massa Ekstrak Hasil Maserasi	48
4.2. Nilai K_M dan V_{max} α -amilase dan α -glukosidase	67



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Pohon dan morfologi daun Bungur	6
2.2 Struktur senyawa aktif <i>Lagerstroemia speciosa</i> yang berhasil diisolasi	7
2.3 Pohon dan morfologi daun Maitan	8
2.4 Struktur senyawa aktif <i>Lunasia amara</i> yang berhasil diisolasi	9
2.5 Struktur Fenol	10
2.6 Struktur fenolik sederhana floroglukinol dan resorsinol	11
2.7 Struktur asam galat dan asam kafeat	11
2.8 Struktur Umbeliferon	11
2.9 Struktur senyawa <i>resveratrol</i>	12
2.10 Struktur kimia flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid	13
2.11 Jalur biosintesis flavonoid dan hubungan antar senyawanya	13
2.12 Struktur <i>podophyllotoxin</i>	14
2.13 Jalur biosintesis lignan dan lignin	14
2.14 Struktur (+)-pinoresinol	15
2.15 Struktur Proisianidin B2 (epikatekin-(4 β →8')-epikatekin)	16
2.16 Struktur salah satu senyawa golongan Gallotanin (tanin terkondensasi)	16
2.17 Struktur Akutissimin A	16
2.18 Peran masing-masing gugus fungsi pada senyawa <i>quercetin</i>	20
2.19 Reaksi pengikatan logam oleh senyawa fenolik dengan gugus katekol	21
2.20 Struktur inhibitor sintetik α -amilase dan α -glukosidase	22
2.21 Kurva pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi	24
2.22 Kurva Lineweaver-Burk	25
2.23 Tiga tipe penghambatan enzim secara reversibel	26
2.24 Reaksi pembentukan ion fenolat dari asam galat	27
2.25 Reaksi pembentukan kompleks berwarna dari kuersetin	28
2.26 Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan	29
2.27 Reaksi autooksidasi pirogalol	29
2.28 Mekanisme reaksi peredaman radikal anion superoksida oleh kuersetin	30
2.29 Reaksi reduksi ion Fe ³⁺ oleh asam askorbat	31
2.30 Reaksi radikal hidroksil dengan 2-deoksi-D-ribosa	31
2.31 Reaksi pembentukan MDA-ATB <i>adduct</i> yang berwarna merah muda	32
2.32 Mekanisme reaksi peredaman radikal hidroksil oleh kuersetin	32
2.33 Struktur Amilum	33
2.34 Reaksi reduksi DNS dengan gula pereduksi	33

2.35	Reaksi hidrolisis maltosa oleh α -glukosidase	34
2.36	Reaksi oksidasi glukosa oleh glukosa oksidase	35
2.37	Reaksi oksidasi hidrogen peroksida oleh <i>horseradish peroxidase</i>	35
3.1	Kurva hasil pengeplotan waktu inkubasi dan konsentrasi maltosa	45
3.2	Kurva hasil pengeplotan waktu inkubasi dan konsentrasi glukosa	45
4.1	Total fenolik ekstrak daun Bungur dan Maitan	49
4.2	Total flavonoid ekstrak daun Bungur dan Maitan	51
4.3	Perbandingan total fenolik dan flavonoid ekstrak daun Bungur dan Maitan	52
4.4	Nilai IC_{50} peredaman radikal DPPH oleh ekstrak daun Bungur dan Maitan	54
4.5	Persen peredaman radikal anion superoksida oleh ekstrak daun Bungur dan Maitan	56
4.6	Persen peredaman radikal hidroksil oleh ekstrak daun Bungur dan Maitan	57
4.7	Perbandingan aktivitas peredaman radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil oleh ekstrak daun Bungur dan Maitan	58
4.8	Persen penghambatan α -amilase oleh ekstrak daun Bungur dan Maitan	61
4.9	Persen penghambatan α -glukosidase oleh ekstrak daun Bungur dan Maitan	62
4.10	Perbandingan aktivitas penghambatan α -amilase dan α -glukosidase oleh ekstrak daun Bungur dan Maitan	63
4.11	Kurva Lineweaver-Burk α -amilase	66
4.12	Kurva Lineweaver-Burk α -glukosidase	66
4.13	Struktur <i>quercetagenin</i>	68
4.14	Interaksi <i>quercetagenin</i> dengan α -amilase	68
4.15	Struktur inhibitor α -glukosidase	69

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Validasi Tanaman Bungur dan Maitan	78
Lampiran 2. Perhitungan Massa Ekstrak	79
Lampiran 3. Konsentrasi Ekstrak untuk Analisis Total Fenolik dan Flavonoid	79
Lampiran 4. Kurva Standar Asam Galat dan Total Fenolik Ekstrak	79
Lampiran 5. Kurva Standar Kuersetin dan Total Flavonoid Ekstrak	81
Lampiran 6. Nilai IC_{50} Radikal DPPH	82
Lampiran 7. Persen Peredaman Radikal Anion Superoksida	84
Lampiran 8. Persen Peredaman Radikal Hidroksil	85
Lampiran 9. Persen Penghambatan α -Amilase	86
Lampiran 10. Persen Penghambatan α -Glukosidase	87
Lampiran 11. Kurva Standar Maltosa dan Nilai V_0 α -Amilase	88
Lampiran 12. Kurva Standar Glukosa dan Nilai V_0 α -Glukosidase	89
Lampiran 13. Nilai $K_M V_{max}$ α -Amilase dan α -Glukosidase	90

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bungur (*Lagerstroemia speciosa*) dan Maitan (*Lunasia amara* Blanco) adalah tanaman yang dilaporkan memiliki kandungan senyawa fenolik. Bungur diketahui mengandung senyawa fenolik seperti flavonoid, tanin, kumarin, dan neolignan (Dalimartha, 2003; Huang *et al.*, 2013), sedangkan maitan diketahui mengandung senyawa fenolik yaitu flavonoid (Sidik, 1999). Bungur dan Maitan juga merupakan tanaman obat yang tumbuh subur di kawasan hutan konservasi Taman Nasional Meru Betiri Jember.

Fenolik merupakan salah satu kelompok besar senyawa metabolit sekunder yang umumnya dijumpai pada tanaman tingkat tinggi. Kelompok senyawa ini menarik banyak perhatian pada beberapa tahun terakhir karena potensinya sebagai antioksidan dan efeknya dalam mencegah berbagai penyakit degeneratif (Manach *et al.*, 2005). Fenolik adalah kelompok senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatik (Vermerris & Nicholson, 2006). Beberapa penelitian melaporkan bahwa ekstrak fenolik dari berbagai tanaman memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, selain itu beberapa diantaranya juga memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim, khususnya enzim yang bekerja menghidrolisis karbohidrat seperti α -amilase dan α -glukosidase (Shan *et al.*, 2005; Moradi-Afrapoli *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2011; McCue *et al.*, 2004).

Salah satu penyakit degeneratif yang perkembangannya dimediasi oleh stres oksidatif adalah Diabetes Melitus (DM) (Dewanjee *et al.*, 2009). Stres oksidatif adalah suatu kondisi di mana sistem pertahanan antioksidan dalam tubuh tidak mampu mengatasi tingginya jumlah Spesies Oksigen Reaktif (SOR) di dalam tubuh atau yang dikenal dengan radikal bebas. Kondisi ini menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif pada berbagai biomakromolekul seperti enzim, protein, lipid,

bahkan DNA yang akhirnya merujuk pada timbulnya berbagai macam penyakit degeneratif (Henriksen *et al.*, 2011). Antioksidan adalah senyawa yang dapat menunda atau memperlambat, menghambat, atau mencegah proses oksidasi terhadap suatu molekul target melalui peredaman radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif (Ames *et al.*, 1993). Oleh karena itu, asupan antioksidan sangat diperlukan oleh tubuh untuk mencegah dan menangkal efek negatif radikal bebas. Saat ini telah banyak tersedia agen antioksidan sintetik yang beredar di pasaran. Namun menurut Nadheesha *et al.* (2007), antioksidan sintetik seperti Butil Hidroksianisol (BHA) dan Butil Hidroksitoluena (BHT) memiliki efek toksikologi dan karsinogenik.

Senyawa fenolik selain memiliki aktivitas sebagai antioksidan, beberapa anggotanya juga dilaporkan memiliki aktivitas sebagai inhibitor α -amilase dan α -glukosidase (Piparo *et al.*, 2008; Moradi-Afrapoli *et al.*, 2012). Inhibitor α -amilase dan α -glukosidase adalah senyawa yang dapat menghambat kerja enzim α -amilase dan α -glukosidase. Enzim α -amilase bekerja menghidrolisis polisakarida kompleks menjadi oligosakarida, sedangkan α -glukosidase bekerja menghidrolisis oligosakarida lebih lanjut menjadi monomer glukosa. Inhibitor α -amilase dan α -glukosidase banyak digunakan sebagai agen antidiabetik. Pengurangan penyerapan karbohidrat dari makanan oleh usus merupakan sebuah pendekatan terapeutik untuk mengontrol kadar glukosa darah sebagai terapi DM khususnya tipe 2.

Salah satu inhibitor sintetik α -amilase dan α -glukosidase yang banyak digunakan adalah akarbosa. Namun obat ini juga dilaporkan menyebabkan berbagai efek samping (Feng *et al.*, 2011) sehingga banyak usaha yang dilakukan saat ini untuk menemukan agen inhibitor alami untuk mengobati diabetes. Oleh sebab itu pada penelitian ini dilakukan studi aktivitas ekstrak daun Bungur dan Maitan sebagai antioksidan alami serta inhibitor enzim α -amilase dan α -glukosidase sehingga nantinya dapat diketahui apakah ekstrak daun Bungur dan Maitan ini dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai obat alami antidiabetik. Menurut Shibano *et al.* (2008) kombinasi antioksidan dan inhibitor α -amilase atau α -glukosidase akan lebih efektif dalam terapi pengobatan DM tipe 2. Ekstrak teraktif sebagai inhibitor α -

amilase serta α -glukosidase akan ditentukan kinetika inhibisinya untuk mengetahui tipe penghambatannya.

Ekstraksi pelarut merupakan metode yang paling umum digunakan untuk mengekstrak senyawa-senyawa metabolit sekunder seperti fenolik dari tanaman karena efisien dan mudah diaplikasikan (Dai & Mumper, 2010). Ekstraksi senyawa metabolit sekunder dari tanaman dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kepolaran pelarut yang digunakan, lama ekstraksi, dan suhu. Oleh karena itu, ekstraksi senyawa bioaktif dari daun Bungur dan Maitan dilakukan secara bertingkat menggunakan beberapa jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda dari nonpolar hingga polar.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka yang menjadi rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana aktivitas ekstrak daun Bungur dan Maitan sebagai antioksidan?
2. Bagaimana aktivitas ekstrak daun Bungur dan Maitan sebagai inhibitor α -amilase dan α -glukosidase?
3. Bagaimana kinetika inhibisi α -amilase dan α -glukosidase oleh ekstrak yang paling aktif sebagai inhibitor?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sampel daun Bungur dan Maitan diambil di kawasan Taman Nasional Meru Betiri Jember secara acak.
2. Ekstraksi dilakukan secara bertingkat menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu heksana, etil asetat, dan metanol.
3. Aktivitas antioksidan diuji menggunakan metode peredaman radikal DPPH, peredaman radikal anion superoksida dan peredaman radikal hidroksil.

4. Analisis kinetika inhibisi enzim hanya dilakukan pada ekstrak yang memiliki aktivitas inhibisi tertinggi.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengkaji aktivitas ekstrak daun Bungur dan Maitan sebagai antioksidan.
2. Mengkaji aktivitas ekstrak daun Bungur dan Maitan sebagai inhibitor α -amilase dan α -glukosidase.
3. Mengetahui mekanisme inhibisi α -amilase dan α -glukosidase oleh ekstrak teraktif sebagai inhibitor.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat untuk:

1. Memberikan informasi yang bermanfaat bagi masyarakat dan peneliti mengenai potensi ekstrak daun Bungur dan Maitan sebagai agen antidiabetik ditinjau dari aktivitasnya sebagai antioksidan dan inhibitor α -amilase dan α -glukosidase.
2. Memberikan informasi pengaruh jenis pelarut yang digunakan aktivitas ekstrak daun Bungur dan Maitan sebagai antioksidan dan inhibitor α -amilase dan α -glukosidase.
3. Memberikan informasi perbandingan aktivitas ekstrak daun Bungur dan Maitan sebagai antioksidan dan inhibitor α -amilase dan α -glukosidase.
4. Memberikan informasi mekanisme penghambatan α -amilase dan α -glukosidase oleh ekstrak yang paling aktif sebagai inhibitor.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Taman Nasional Meru Betiri

Taman Nasional Meru Betiri (TNMB) merupakan kawasan pelestarian alam yang terletak di dua kabupaten yaitu Kabupaten Jember dan Kabupaten Banyuwangi dengan luas keseluruhan 58.000 ha. Sebagai kawasan hutan konservasi, TNMB memiliki kekayaan keanekaragaman hayati yang cukup banyak. Hingga saat ini telah teridentifikasi flora sebanyak 518 jenis, terdiri dari 15 jenis yang dilindungi dan 503 jenis yang tidak dilindungi. Contoh jenis yang dilindungi yaitu Balanopora (*Balanophora fungosa*) dan Padmosari/Rafflesia (*Rafflesia zollingeriana*) yang merupakan flora endemik TNMB. Selain itu, di antara berbagai jenis flora tersebut, terdapat sebanyak 239 jenis yang teridentifikasi sebagai bahan baku obat/jamu tradisional, dua diantaranya adalah Bungur (*Lagerstroemia speciosa*) dan Maitan (*Lunasia amara* Blanco) (Balai Taman Nasional Meru Betiri, 2014).

Menurut Dalimartha (2003), Bungur memiliki khasiat mengobati tekanan darah tinggi, diabetes, kencing batu, kencing darah, diare, dan disentri. Maitan memiliki khasiat sebagai obat antidiare, penyakit kulit, penawar racun, penghambat pertumbuhan bakteri, mengatasi gangguan seksualitas pada pria, dan untuk menyembuhkan penyakit akibat gangguan dalam organ pencernaan (Trubus, 1999).

2.2 Bungur / Ketanggi (*Lagerstroemia speciosa*)

Bungur adalah tumbuhan jenis pohon dengan tinggi mencapai 10-30 meter, batang bulat berwarna coklat muda. Daun berwarna hijau tua, bentuk oval, elips, atau memanjang, dan bunganya berwarna ungu (Anonim, 2014). Bentuk pohon dan morfologi daun Bungur ditunjukkan oleh Gambar 2.1 berikut.



Gambar 2.1 Pohon dan morfologi daun Bungur

Secara taksonomi, Bungur diklasifikasikan sebagai berikut (Plantamor, 2014):

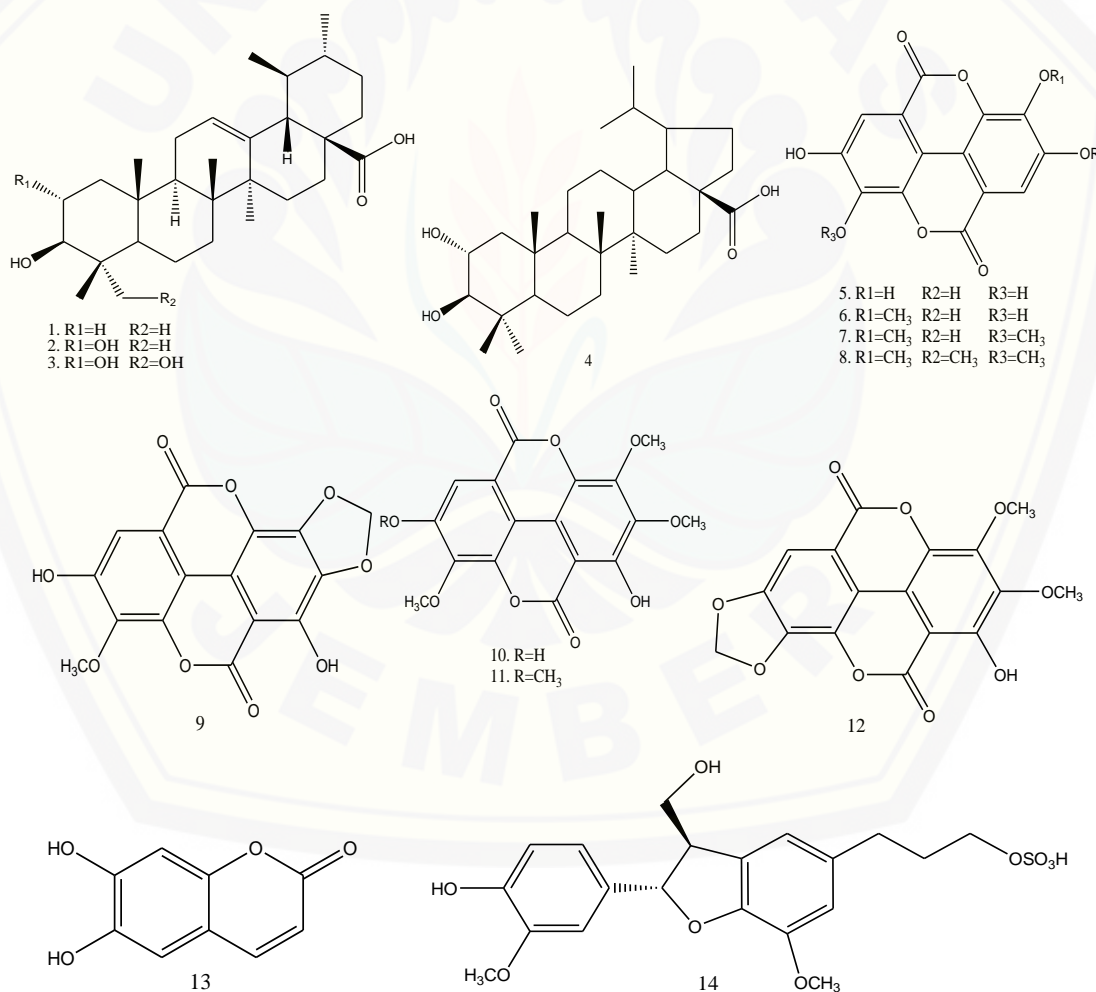
Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub devisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Myrtales
Famili	: Lythraceae
Genus	: <i>Lagerstroemia</i>
Jenis	: <i>Lagerstroemia speciosa</i>

Tanaman Bungur dalam pengobatan tradisional biasanya digunakan sebagai obat diabetes dalam bentuk rebusan daun. Biji tanaman ini dapat digunakan untuk mengobati tekanan darah tinggi dan kencing manis. Daunnya digunakan untuk mengobati kencing batu, kencing manis, dan tekanan darah tinggi, sedangkan kulit kayu digunakan untuk mengobati diare, disentri dan kencing darah (Dalimartha, 2003).

Beberapa hasil penelitian melaporkan adanya potensi ekstrak daun Bungur dari beberapa pelarut dalam menurunkan kadar glukosa darah penderita DM baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Hasil penelitian Judy *et al.* (2003) menunjukkan daun bungur yang diekstrak menggunakan etanol 80% memiliki aktivitas antihiperlikemik untuk diabetes tipe 2 yang diuji secara *in vivo*. Hou *et al.* (2008) juga mencoba mengekstrak daun Bungur menggunakan pelarut etil asetat dan hasil uji secara *in vitro* menunjukkan adanya aktivitas antihiperlikemik. Hasil penelitian Hernawan dan Setyawan (2004) menyatakan ekstrak air daun bungur menunjukkan aktivitas

hipoglikemik dan hipolipidemik pada dosis tertentu yang diuji secara *in vivo*. Namun masih belum diketahui apakah aktivitas antidiabetiknya berasal dari senyawa yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim dan antioksidan atau tidak, khususnya untuk senyawa fenolik yang dikandungnya.

Daun bungur memiliki kandungan kimia seperti saponin, flavonoid, dan tannin. Kulit batang mengandung flavonoid dan tanin, sedangkan bijinya mengandung senyawa plantisul (Dalimartha, 2003). Empat belas senyawa telah berhasil diisolasi dari *Lagerstroemia speciosa* yaitu empat senyawa triterpen (1-4), delapan senyawa *ellagic acid* (5-12), satu kumarin (13) dan satu neolignan (14) (Huang *et al.*, 2013).



Gambar 2.2 Struktur senyawa aktif *Lagerstroemia speciosa* yang berhasil diisolasi

2.3 Maitan / Kemaitan / Sanrego (*Lunasia amara* Blanco)

Maitan merupakan tanaman berbentuk pohon rendah (perdu) dengan tinggi mencapai 5 meter dan diameter 12 cm, keras dan licin. Maitan memiliki kulit batang yang pahit dan beracun, berdaun lebat dan tersusun spiral, daun mudanya ditutupi bulu-bulu berwarna putih dan coklat, dengan bunga berwarna kuning pucat berukuran kecil (Trubus, 1999). Bentuk pohon dan daun Maitan ditunjukkan oleh Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Pohon dan morfologi daun Maitan

Secara taksonomi, Maitan diklasifikasikan sebagai berikut (Trubus, 1999):

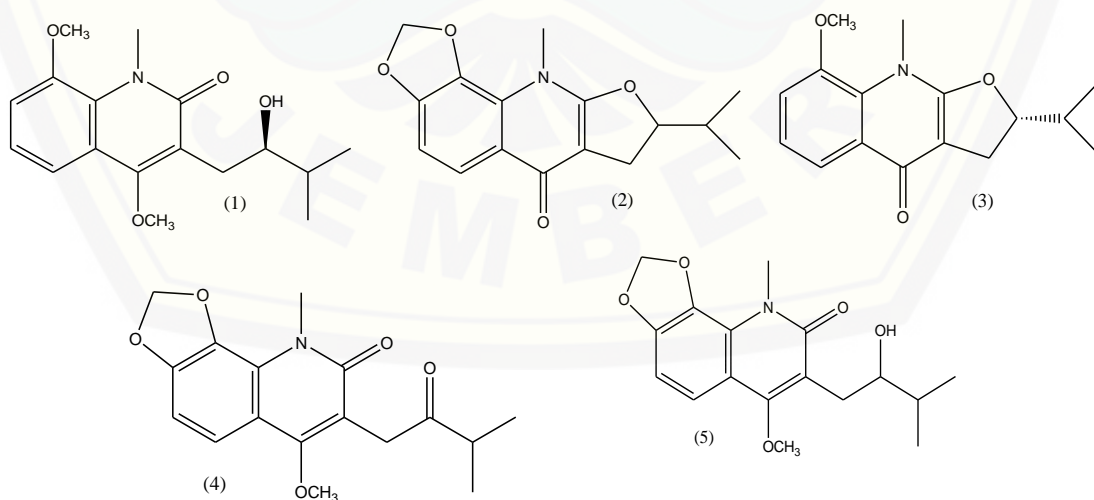
Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Sapindales
Famili	: Rutaceae
Genus	: <i>Lunasia</i>
Spesies	: <i>Lunasia amara</i> Blanco

Lunasia amara mempunyai beberapa nama daerah yaitu Kemaitan, Maitan (Jawa), Mamaitan (Madura), Makelum halaluna, Aifafa, Pintan (Minahasa), Bungkus susu (Maluku), dan Sanrego (Bone) (Trubus, 1999).

Sampai saat ini bagian yang dimanfaatkan dari Maitan adalah bagian daun dan kulit batang yang dikeringkan. Adapun manfaat dari Maitan adalah sebagai obat

gosok bagian tubuh yang bengkak, obat koskado, dan obat afrodisiak (Sidik, 1999). Daun Maitan digunakan sebagai obat bengkak dan penyubur rambut, sedangkan kulit batangnya digunakan sebagai obat nyeri perut, penawar racun ular dan serangga (EISAI, 1995). Trubus (1999) menyebutkan bahwa Maitan bermanfaat sebagai pelancar saluran urin, memacu gairah seksual, kosmetik, penghambat pertumbuhan bakteri (*Eschericia coli*, *Shygella bodyl*, dan *Staphyllococcus areus*), obat diare, penawar racun makanan dan bisa ular serta mengatasi kelainan kulit. Penelitian yang mengeksplorasi tentang potensi Maitan sebagai obat antidiabetes belum ada. Namun menurut Patel *et al.* (2012), ekstrak *Aegle marmelos* yang merupakan tanaman satu famili dengan Maitan (famili *Rutaceae*) memiliki potensi sebagai antidiabetik. Potensi tersebut berasal dari senyawa metabolit sekunder golongan fenolik. Selain itu, Mukherjee *et al.* (2006) melaporkan bahwa *Murraya koenigii* yang juga satu famili dengan Maitan memiliki aktivitas antidiabetik.

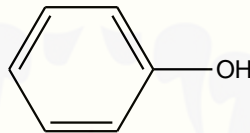
Kulit batang, akar, dan daun Maitan mengandung beberapa zat kimia yang penting yaitu alkaloid seperti *lunacridine* (1), *lunacine*, dan *lunanine* (2), kemudian ada sitosterol dan glikosida (Trubus, 1999). Sidik (1999) menyebutkan bahwa Maitan mengandung fitosterol, flavonoid, dan alkaloid seperti *edulein*, *graveolin*, *hidroksin*, *benakrin*, *lunacridine*, *lunacrine* (3), *lunamarin*, *lunidonine* (4), dan *lunidine* (5).



Gambar 2.4 Struktur beberapa senyawa aktif *Lunasia amara* yang berhasil diisolasi

2.4 Senyawa Bioaktif: Fenolik

Fenolik merupakan salah satu kelompok besar senyawa metabolit sekunder yang umumnya dijumpai pada tanaman tingkat tinggi. Kelompok senyawa ini menarik banyak perhatian karena potensinya sebagai antioksidan dan efeknya dalam mencegah berbagai penyakit yang berhubungan dengan stres oksidatif seperti Diabetes Melitus (Manach *et al.*, 2005). Fenolik adalah kelompok senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatik (Vermerris & Nicholson, 2006).



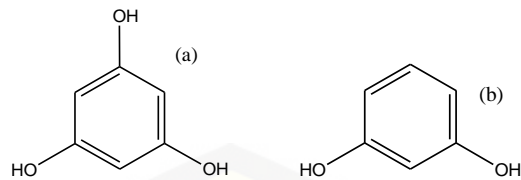
Gambar 2.5 Fenol

Banyaknya variasi gugus yang mungkin tersubstitusi pada kerangka utama fenol menyebabkan kelompok fenolik memiliki banyak sekali anggota. Menurut Marinova *et al.* (2005), terdapat lebih dari 8000 jenis senyawa yang termasuk dalam golongan senyawa fenolik mulai dari yang paling sederhana dengan berat molekul kecil hingga senyawa yang kompleks dengan berat molekul lebih dari 30.000 Da.

Senyawa fenolik pada tanaman terdapat dalam bentuk fenol sederhana maupun polifenol tergantung jumlah unit fenol dalam suatu molekul. Senyawa fenolik pada tanaman meliputi golongan fenol sederhana, asam fenolat, kumarin, stilben, flavonoid, lignin, lignan, dan tanin (Soto-Vaca *et al.*, 2012).

2.4.1 Fenolik Sederhana

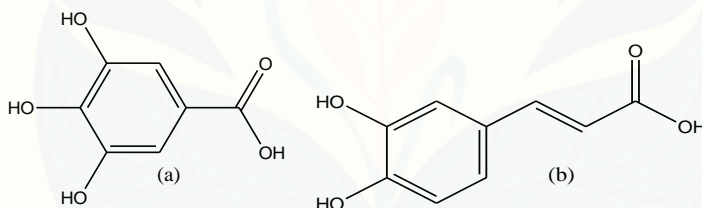
Senyawa fenolik sederhana merupakan hasil substitusi satu atau dua gugus fenol dalam posisi orto, meta, atau para. Contoh senyawa fenolik sederhana yaitu floriglukinol (1,3,5-trihidroksibenzena) dan resorsinol (1,3-dihidroksibenzena) (Vermerris & Nicholson, 2006).



Gambar 2.6 Fenolik sederhana, (a) floroglukinol dan (b) resorsinol

2.4.2 Asam Fenolat

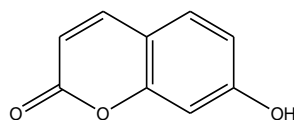
Asam fenolat merupakan salah satu kelas fenolik utama dalam tanaman. Asam fenolat dibagi menjadi dua kelas, pertama turunan asam benzoat contohnya *gallic acid* dan *protocatechuic acid*, yaitu fenol yang tersubstitusi oleh gugus karboksil. Asam galat (*gallic acid*) merupakan trifenol yang biasa terdapat di daun teh dalam bentuk teresterifikasi bersama dengan katekin. Kelas kedua adalah turunan asam sinamat contohnya *coumaric acid* dan *caffeic acid*. Asam kafeat (*caffeic acid*) adalah asam fenolat yang paling melimpah dalam berbagai buah-buahan dan sayuran, dan merupakan senyawa fenolik utama dalam kopi (D'Archivio *et al.*, 2007).



Gambar 2.7 (a) asam galat; (b) asam kafeat

2.4.3 Kumarin (Coumarins)

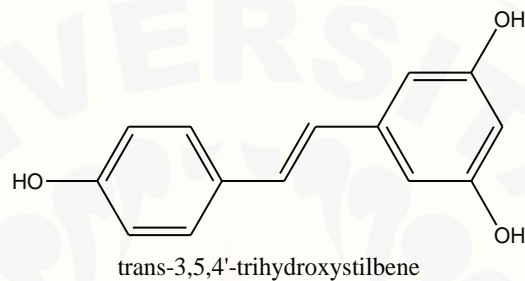
Keberadaan senyawa kumarin cukup berlimpah di tanaman dalam bentuk bebas atau sebagai polimer di dinding sel. Kumarin memiliki kerangka dasar C_6-C_3 yang mirip dengan fenilpropanoid namun dengan atom oksigen pada gugus karboksil yang mengalami siklisasi. Contoh senyawa kumarin sederhana adalah umbeliferon (Vermerris & Nicholson, 2006).



Gambar 2.8 Umbeliferon

2.4.4 Stilben

Stilbenoid merupakan senyawa fenolik yang sering terdapat pada batang kayu. Stilben memiliki struktur kerangka $C_6-C_2-C_6$. Jenis stilbenoid yang paling terkenal adalah *resveratrol* yang dapat ditemukan pada *Veratrum album* var. *grandiflorum* dan memiliki fungsi sebagai antioksidan, antiinflamatori, dan antialergi pada manusia (Pengelly, 2004).

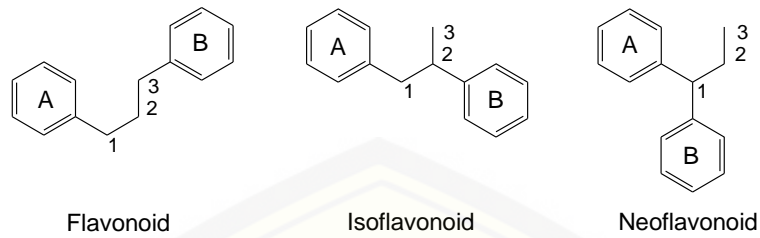


Gambar 2.9 Struktur senyawa *resveratrol*

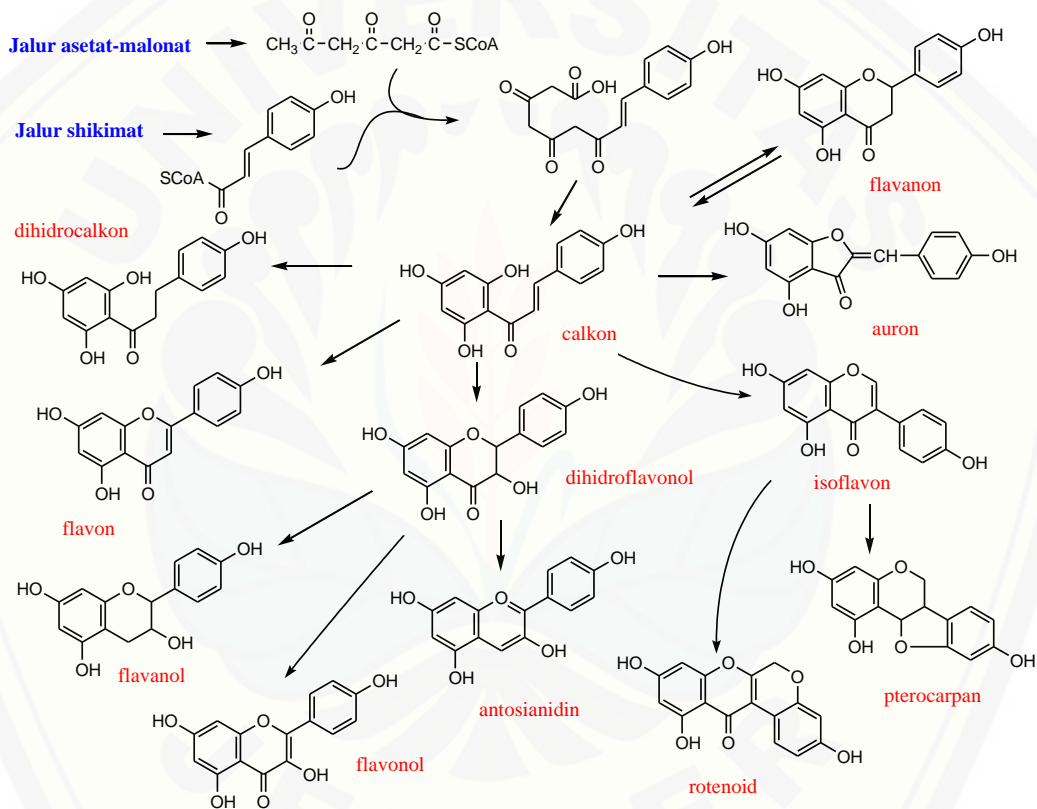
2.4.5 Flavonoid

Flavonoid tersebar luas di tanaman tingkat tinggi dan bahkan di tanaman tingkat rendah seperti alga. Flavonoid memiliki struktur dasar yang dibangun oleh 15 atom C berupa dua cincin aromatik yang disebut cincin A dan B yang dihubungkan dengan tiga karbon ($C_6-C_3-C_6$). Cincin A adalah gugus benzoil dan cincin B adalah gugus sinamoil. Hampir semua senyawa flavonoid berpotensi sebagai antioksidan.

Flavonoid memiliki dua kelas lagi yang dibedakan berdasarkan posisi ikatan cincin B dengan tiga karbon penghubungnya, yaitu isoflavonoid dan neoflavonoid. Flavonoid merupakan turunan dari 1,3-difenilpropana dan isoflavonoid diturunkan dari 1,2-difenilpropana sedangkan neoflavonoid dari 1,1-difenilpropana (Gambar 2.10). Jalur biosintesis flavonoid dan hubungan antar senyawa flavonoid ditunjukkan pada Gambar 2.11 (Vermerris & Nicholson, 2006).

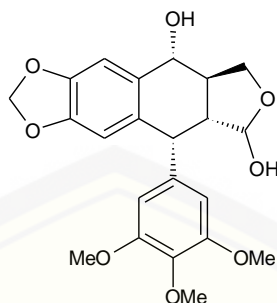
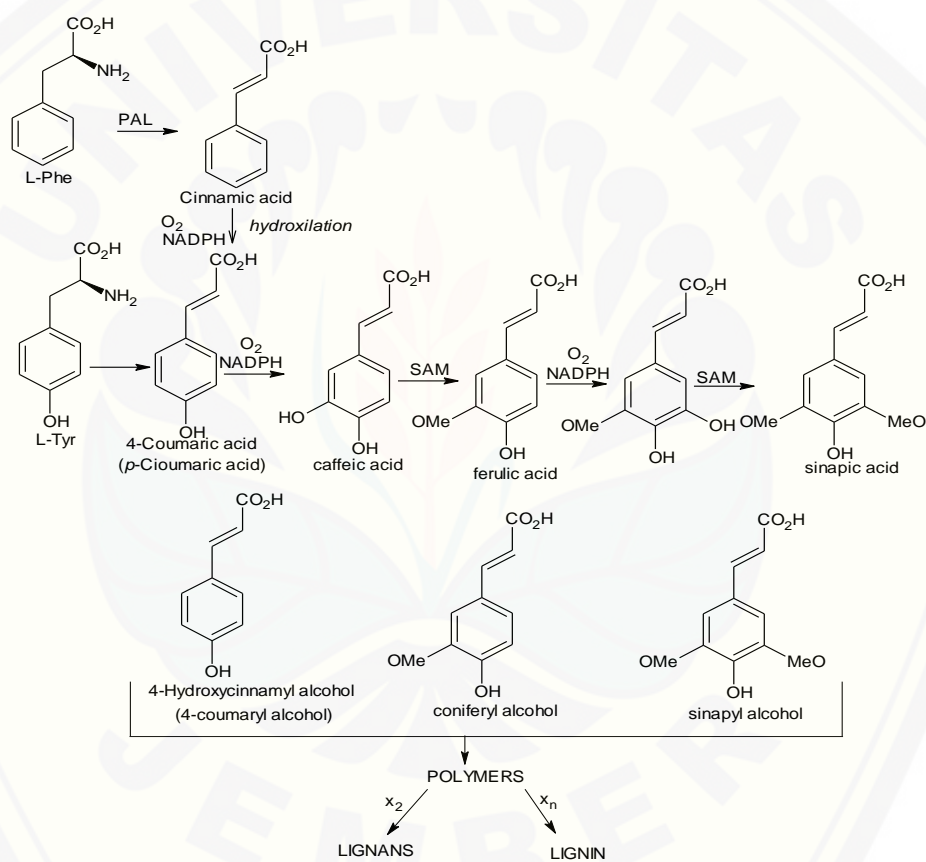


Gambar 2.10 Struktur kimia flavonoid, isoflavonoid dan neoflavonoid



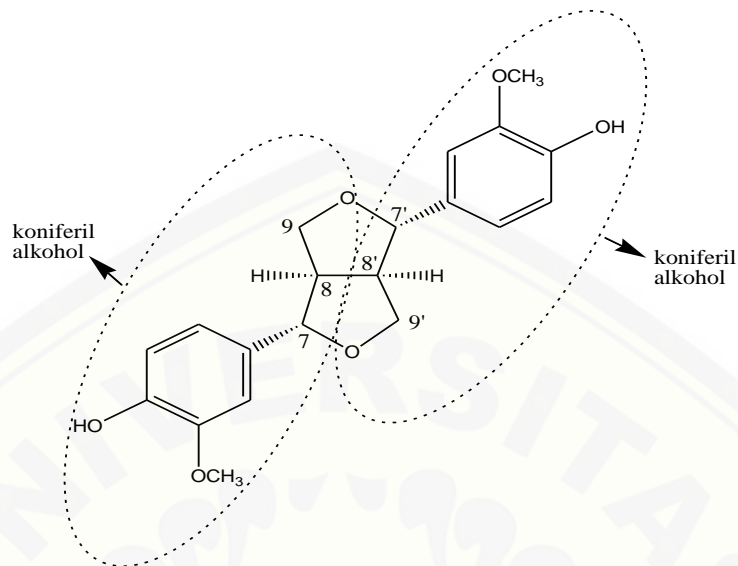
2.4.6 Lignan, Neolignan, dan Lignin

Lignan dan neolignan merupakan dimer dari molekul fenilpropana antara lain *p*-kumaril alkohol, koniferil alkohol, dan sinapil alkohol. *Podophyllotoxin* merupakan salah satu contoh senyawa lignan (Gambar 2.12). Jalur biosintesis senyawa fenilpropanoid penyusun lignan dan neolignan ditunjukkan pada Gambar 2.13.

Gambar 2.12 Struktur *podophyllotoxin*

Gambar 2.13. Jalur biosintesis lignan dan lignin (Dewick, 2002)

Istilah lignan dan neolignan dibedakan berdasarkan posisi ikatannya. Struktur lignan dibentuk melalui *coupling* ikatan C_{β} - $C_{\beta'}$ atau C_8 - C_8' dari dua molekul fenilpropana sedangkan neolignan dibentuk dengan tipe ikatan selain itu. Lignin adalah polimer dari lignan atau neolignan (Sarker & Nahar, 2007). Contoh ikatan C_8 - C_8' dapat dilihat pada gambar 2.14.



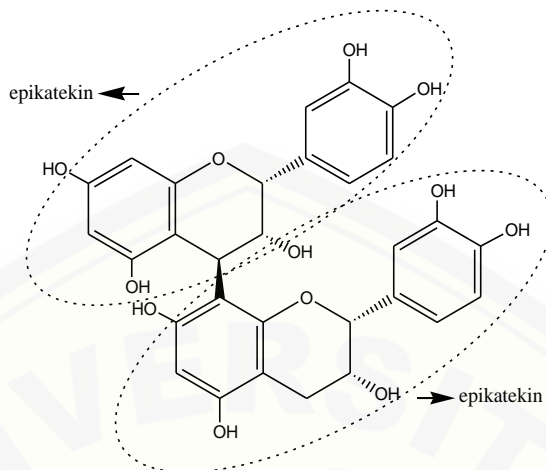
Gambar 2.14. (+)-pinoresinol

2.4.7 Tanin

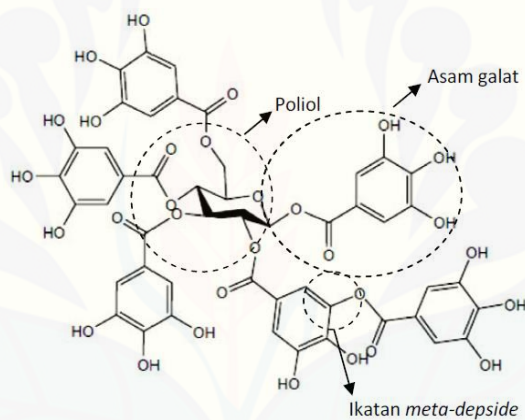
Tanin merupakan salah satu kelompok utama polifenol. Khanbabee dan Van Ree (2001) mengelompokkan tanin menjadi tiga, yaitu tanin terkondensasi, tanin terhidrolisis, dan tanin kompleks. Tanin terkondensasi atau proantosianidin merupakan oligomer atau polimer dari flavonoid yang mengandung unit flavan-3-ol (katekin). Contoh tanin terkondensasi adalah prosianidin B2 (epikatekin-(4 β →8')-epikatekin) (Gambar 2.15).

Tanin terhidrolisis adalah kelompok senyawa yang jika dihidrolisis akan menghasilkan residu gula (poliol) dan asam galat. Contoh tanin terhidrolisis adalah kelompok senyawa gallotanin (Gambar 2.16).

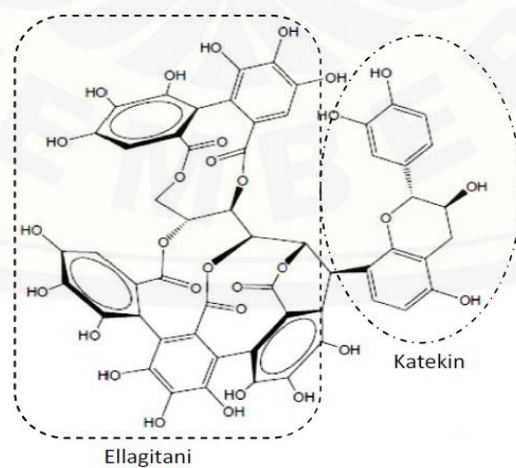
Tanin kompleks, sesuai dengan namanya memiliki struktur yang kompleks. Tanin jenis ini merupakan hasil dari glikosidasi gallotanin atau ellagitanin dengan unit katekin. Contoh tanin kompleks adalah Akutissimin A (Gambar 2.17).



Gambar 2.15 Prosianidin B2 (epikatekin-(4 β →8')-epikatekin)



Gambar 2.16 Struktur salah satu senyawa golongan Gallotanin (tanin terhidrolisis) (Vermerris & Nicholson, 2006).



Gambar 2.17 Akutissimin A (Vermerris & Nicholson, 2006).

2.5 Ekstraksi Senyawa Bioaktif

Ekstraksi adalah suatu metode operasi yang digunakan dalam pemisahan komponen-komponen terlarut dari komponen yang tidak larut dari suatu campuran dengan pelarut yang sesuai (Leniger & Beverloo, 1975). Proses ekstraksi dipengaruhi oleh lama ekstraksi, suhu, dan jenis pelarut yang digunakan. Untuk ekstraksi bahan aktif dari simplisia, pelarut harus berdifusi dan senyawa aktif harus cukup larut dalam pelarut, artinya pelarut harus memiliki kepolaran yang sama dengan zat yang akan diekstrak sehingga akan tercapai kesetimbangan antara zat yang terlarut (*solute*) dan pelarut (*solvent*). Jika komponen yang akan diekstrak belum diketahui tingkat kepolarannya seperti pada ekstraksi senyawa bioaktif dari tumbuhan, biasanya digunakan beberapa pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda, dan proses ekstraksi dilakukan berulang kali hingga semua senyawa dapat terekstrak dengan maksimal.

Metode ekstraksi yang dilakukan tergantung pada beberapa faktor antara lain tujuan ekstraksi, skala ekstraksi, sifat komponen yang akan diekstrak, dan sifat pelarut yang akan digunakan. Beberapa metode umum ekstraksi yang biasa dilakukan adalah ekstraksi dengan pelarut, distilasi, *Supercritical Fluid Extraction* (SFE), pengepresan mekanik, dan sublimasi. Diantara metode-metode tersebut, metode yang banyak dilakukan adalah distilasi dan ekstraksi menggunakan pelarut (Houghton & Raman, 1998). Prinsip ekstraksi menggunakan pelarut adalah bahan yang akan diekstrak kontak langsung dengan pelarut selama selang waktu tertentu dan komponen yang akan diekstrak akan terlarut dalam pelarut. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut sendiri ada dua cara, yaitu cara dingin dan cara panas.

Senyawa fenolik pada tanaman tingkat tinggi secara umum terdegradasi pada suhu tinggi oleh reaksi yang tidak diinginkan seperti oksidasi enzimatis (Biesaga & Pyrzynska, 2013; Davidov-Pardo, 2011), sehingga metode ekstraksi dengan suhu normal (cara dingin) menjadi pilihan yang tepat. Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi pelarut dengan cara dingin. Simplisia diekstraksi menggunakan pelarut dengan pengadukan terus-menerus pada suhu ruang selama sekitar 72 jam. Campuran

kemudian difiltrasi untuk memisahkan padatan dan cairannya. Maserasi juga merupakan salah satu metode ekstraksi tradisional yang mudah diaplikasikan (ICS-UNIDO, 2008).

Keberagaman senyawa fenolik yang meliputi fenol sederhana, asam benzoat dan sinamat, kumarin, tanin, lignin, lignan, dan flavonoid menyebabkan kesulitan untuk menggunakan satu jenis metode ekstraksi (Khoddami *et al.*, 2013). Ditambah lagi kemampuan senyawa fenolik dalam mengompleks dengan protein, karbohidrat, dan senyawa-senyawa lain menyulitkan proses ekstraksi. Sehingga perlu dilakukan *pretreatment* untuk meningkatkan hasilnya. Weidner *et al.* (2012), menggunakan heksana untuk menghilangkan lemak dari biji anggur sehingga ekstrak fenolik yang didapat meningkat. Menurut Khoddami *et al.* (2013), penggilingan simpilisa dan penghilangan lemak (*defatting*) merupakan kombinasi *pretreatment* yang paling lengkap untuk mendapatkan ekstrak fenolik yang tinggi. Beberapa jenis pelarut dengan berbagai tingkat kepolaran yang umum digunakan dalam mengekstrak senyawa fenolik meliputi air, aseton, etil asetat, alkohol (metanol, etanol, dan propanol) serta campuran dari mereka akan mempengaruhi hasilnya (Gracia-Salas *et al.*, 2010).

2.6 Senyawa Antioksidan

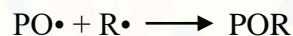
Antioksidan secara umum didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda atau memperlambat, menghambat, atau mencegah proses oksidasi terhadap suatu molekul target melalui peredaman radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif. Antioksidan dalam pengertian kimia adalah senyawa pemberi elektron (*electron donors*). Stres oksidatif adalah suatu keadaan di mana sistem pertahanan antioksidan dalam tubuh tidak mampu mengatasi peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (SOR) contohnya anion superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksil sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif pada berbagai biomakromolekul seperti enzim, protein, lipid, bahkan DNA. Stres oksidatif memainkan peranan penting dalam

perkembangan berbagai penyakit degeneratif kronis termasuk Diabetes Melitus (Ames *et al.*, 1993).

Senyawa antioksidan dapat meredam radikal bebas melalui beberapa mekanisme: (1) meredam spesies radikal seperti SOR; (2) mencegah pembentukan SOR dengan menghambat beberapa enzim atau mengikat logam yang menstimulasi produksi radikal bebas; (3) meningkatkan regulasi dan melindungi pertahanan antioksidan (Cotelle, 2001). Sebagai peredam spesies radikal, senyawa fenolik (POH) mencegah oksidasi lipid dan molekul lain dengan cara mendonasikan atom hidrogennya pada spesies radikal (R):



Intermediet radikal fenoksi (PO•) yang terbentuk dari reaksi tersebut relatif stabil karena adanya efek resonansi sehingga rantai reaksi tidak mudah diinisiasi lebih lanjut. Selain itu, radikal fenoksi juga dapat bertindak sebagai terminator pada reaksi propagasi radikal melalui reaksi dengan radikal bebas lain:



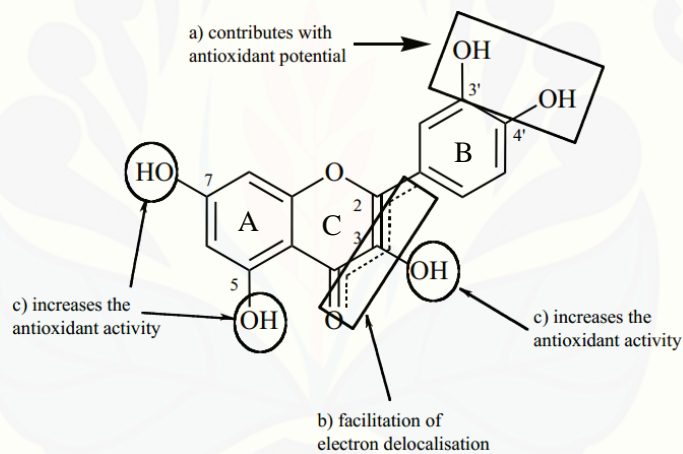
Senyawa fenolik memiliki struktur kimia yang ideal sebagai peredam radikal bebas karena memiliki: (1) gugus hidroksil fenolik yang cenderung mendonasikan atom hidrogennya atau elektronnya pada radikal bebas; (2) sistem konjugasi pada cincin aromatiknya dapat mendelokalisisasi elektron yang tidak berpasangan (*unpaired electron*). Beberapa hubungan antara struktur senyawa fenolik dengan aktivitas antioksidannya dijelaskan sebagai berikut:

- (1) Untuk asam fenolat dan bentuk esternya, kemampuan reduksinya terhadap radikal bebas tergantung pada jumlah gugus hidroksilnya, yang kemudian diperkuat oleh faktor halangan sterik (Dziedzic & Hudson, 1983). Asam hidroksisinamat terbukti lebih efektif daripada asam hidroksibenzoat, mungkin karena efek penstabilan *aryloxy-radical* melalui resonansi dari gugus $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ yang terikat pada cincin fenil, selain itu halangan sterik yang lebih kecil dibanding gugus benzoat (Rice-Evans *et al.*, 1996).

(2) Untuk flavonoid, faktor utama yang menentukan aktivitasnya sebagai antioksidan (Bors & Michel, 2002) adalah:

- Struktur orto-dihidroksi pada cincin B, yang memiliki kemampuan mendonasikan elektron terbaik, memiliki stabilitas tinggi dalam bentuk radikal, dan adanya delokalisasi elektron.
- Ikatan rangkap dua pada atom C2-C3 dengan gugus 4-okso pada cincin C, yang bertanggung jawab terhadap delokalisasi elektron dari cincin B.
- Gugus hidroksil pada atom C5 dan C7 pada cincin A dan C3 pada cincin C yang sangat esensial terhadap potensi maksimum peredaman radikal.

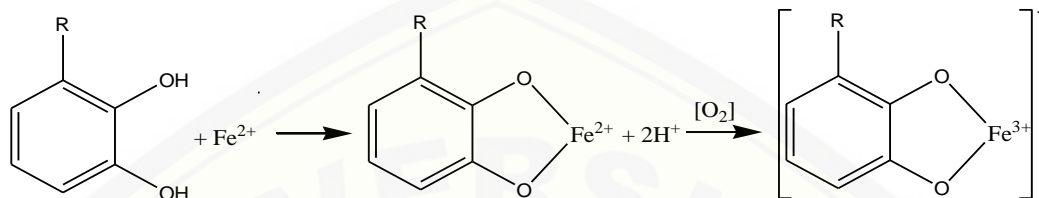
Quercetin adalah contoh senyawa flavonoid yang memiliki ketiga faktor tersebut.



Gambar 2.18 Peran masing-masing gugus fungsi pada *quercetin* (Bubols *et al.*, 2013)

Mekanisme lain dari senyawa fenolik sebagai antioksidan adalah dengan mencegah terbentuknya senyawa oksidan dan radikal bebas secara berlebihan dengan cara mengikat logam-logam transisi seperti Fe dan Cu yang menstimulasi produksi radikal bebas. Senyawa fenolik dengan gugus katekol atau galol mampu membentuk kompleks dengan Fe^{2+} atau Cu^{2+} (Perron & Brumaghim, 2009). Flavonoid dapat mengikat ion logam pada gugus 3',4'-*o*-difenolik pada cincin B, gugus 3,4 atau 3,5-difenolik, dan struktur ketol 4-*keto*,3-hidroksi atau 4-*keto*,5-hidroksi pada cincin C (Hudson & Lewis, 1983). Selain itu, kemampuan mengikat logam dan aktivitas

antioksidan senyawa fenolik seperti flavonoid berhubungan dengan struktur yang memiliki gugus keto-hidroksi (3-OH atau 5-OH dan 4-C=O), dan banyaknya gugus katekol/galol (Khokar & Apenten, 2003).



Gambar 2.19 reaksi pengikatan logam oleh senyawa fenolik dengan gugus katekol.

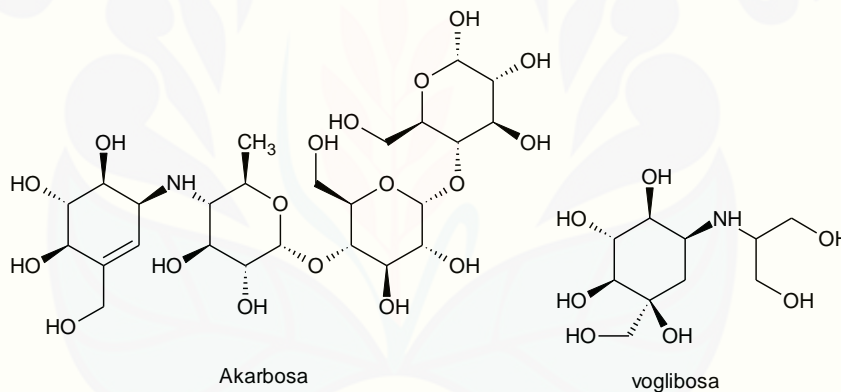
2.7 Inhibitor α -Amilase dan α -Glukosidase

Inhibitor enzim adalah molekul yang dapat mengganggu proses katalisis, memperlambat atau menghentikan reaksi enzimatik. Inhibitor dapat menghambat reaksi enzimatik melalui beberapa mekanisme. Pertama, inhibitor dapat berkompetisi dengan substrat untuk menempati sisi aktif enzim. Hal ini terjadi karena inhibitor memiliki struktur yang mirip dengan substrat. Ketika inhibitor sudah menempati sisi aktif enzim maka substrat tidak dapat masuk sehingga tidak terjadi reaksi enzimatik dan tidak terbentuk produk. Kedua, inhibitor dapat membentuk ikatan kovalen dan mengubah konformasi gugus aktif enzim yang merupakan penentu aktivitas enzim, atau membentuk interaksi nonkovalen yang stabil, sehingga enzim kehilangan aktivitasnya (Nelson & Cox, 2008).

Enzim adalah suatu bentuk protein fungsional yang berperan sebagai biokatalisator yang meningkatkan laju reaksi kimia setidaknya 10^6 kali dibanding reaksi tanpa katalis, tidak ikut bereaksi serta tidak mengalami perubahan selama berlangsungnya reaksi tersebut. Enzim bersifat spesifik untuk reaksi yang dikatalisis maupun substratnya (Murray *et al.*, 2003). Salah satu enzim yang bekerja pada sistem gastrointestinal (pencernaan) adalah enzim α -amilase dan α -glukosidase. Kedua enzim ini berfungsi memecah karbohidrat menjadi glukosa pada usus halus manusia. α -Amilase akan menghidrolisis karbohidrat kompleks seperti pati menjadi produk

campuran oligosakarida. Produk hidrolisis oleh α -amilase seperti maltosa dengan ikatan alfa-1,4-glikosida, isomaltosa dengan ikatan alfa-1,6-glikosida dan sukrosa dengan ikatan alfa-1,2-glikosidanya akan dihidrolisis lebih lanjut menjadi monosakarida α -D-glukosa oleh enzim α -glukosidase (Nakamura *et al.*, 2012).

Inhibitor α -amilase dan α -glukosidase merupakan salah satu agen antidiabetik yang bekerja dengan cara menghambat kerja kedua enzim ini. Pengurangan penyerapan karbohidrat dari makanan oleh usus merupakan sebuah pendekatan terapeutik untuk mengontrol kadar glukosa darah sebagai terapi DM khususnya tipe 2. Inhibitor sintetis untuk α -amilase dan α -glukosidase seperti akarbosa dan voglibosa telah banyak digunakan untuk penanganan pasien DM tipe 2, namun obat ini juga dilaporkan menyebabkan berbagai efek samping (Feng *et al.*, 2011).



Gambar 2.20 Struktur kimia inhibitor sintetis α -amilase dan α -glukosidase

Beberapa studi melaporkan efek senyawa fenolik dalam menghambat enzim yang menghidrolisis karbohidrat. Moradi-Afrapoli *et al.* (2012) melaporkan adanya aktivitas inhibitor α -glukosidase yang lebih baik dari akarbosa pada 13 senyawa fenolik yang berhasil diisolasi dari *Polygonum hyrcanicum* yaitu 10 flavonol, 2 flavan, dan *cinnamoylphenethyl amide*. Kuersetin dan luteolin juga terbukti menghambat α -glukosidase dari ragi yang lebih besar dari akarbosa (Li *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2000). Menurut Piparo *et al.* (2008), senyawa fenolik seperti kuersetagetin mampu menghambat aktivitas α -amilase. Gugus hidroksil pada cincin B dari kuersetagetin dapat berikatan secara kovalen dengan sisi katalitik α -amilase.

Terbentuknya ikatan π yang stabil antara kuersetagetin dengan α -amilase menyebabkan substrat tidak dapat terikat sehingga produk tidak dapat terbentuk.

2.8 Kinetika Inhibisi Enzim

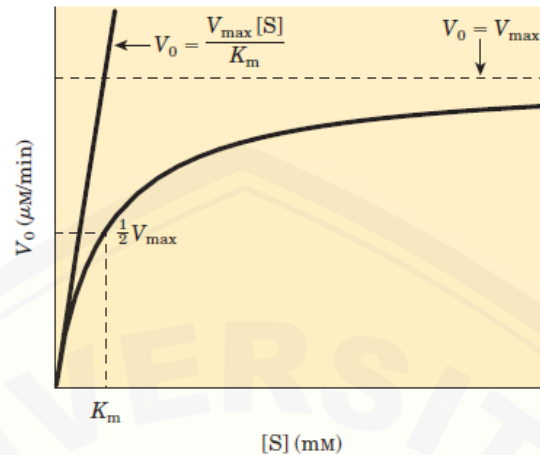
Persamaan Michaelis-Menten merupakan dasar dalam mempelajari semua aspek kinetika inhibisi enzim. Secara sederhana, hipotesis Michaelis dan Menten mengenai perubahan suatu substrat yang dikatalisis oleh enzim dapat digambarkan sebagai berikut



Keterangan: E = enzim; S = substrat; ES = kompleks enzim-substrat; P = produk

Berdasarkan persamaan di atas, enzim selalu terdapat dalam dua bentuk selama reaksi berlangsung, yaitu enzim bebas (E) dan enzim yang sudah terikat ke substrat (ES). Reaksi enzimatik berlangsung melalui dua tahapan utama. Pertama, enzim membentuk kompleks dengan substrat (ES). Reaksi ini bersifat reversibel dan berlangsung relatif cepat. Kedua, kompleks ES yang telah terbentuk mengalami penguraian menghasilkan produk reaksi (P) dan enzim bebas (E). Tahap ini berlangsung relatif lambat sehingga menjadi penentu kecepatan reaksi (Nelson & Cox, 2008).

Peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan v_0 (kecepatan awal) hingga tercapai kecepatan maksimum v_{max} . Jika peningkatan konsentrasi substrat lebih lanjut tidak meningkatkan kecepatan reaksi, maka dalam keadaan ini enzim dikatakan jenuh oleh substrat, di mana semua enzim telah berikatan dengan substrat membentuk ES sehingga konsentrasi enzim bebas (E) akan sangat kecil sekali. Pada saat ini kecepatan reaksi katalitik mencapai maksimum. Hubungan antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatik ditunjukkan pada Gambar 2.21 berikut.



Gambar 2.21 Kurva pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi enzimatik (Nelson & Cox, 2008)

Bentuk kurva tersebut diturunkan dari persamaan Michaelis-Menten yang dinyatakan secara matematis sebagai berikut:

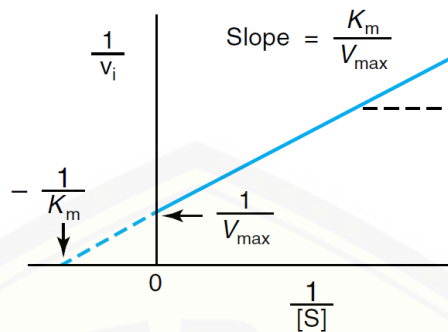
$$v_0 = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.1)$$

Keterangan: v_0 = kecepatan awal pada konsentrasi substrat $[S]$
 V_{maks} = kecepatan maksimum
 K_M = tetapan Michaelis-Menten

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) menunjukkan konsentrasi substrat pada saat kecepatan awal sama dengan separuh dari kecepatan maksimum ($V_{\text{maks}}/2$). Bentuk linier dari persamaan Michaelis-Menten disebut persamaan Lineweaver-Burk digunakan untuk menentukan nilai V_{maks} dan K_M (Murray *et al.*, 2009).

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\text{maks}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{maks}}} \quad (2.2)$$

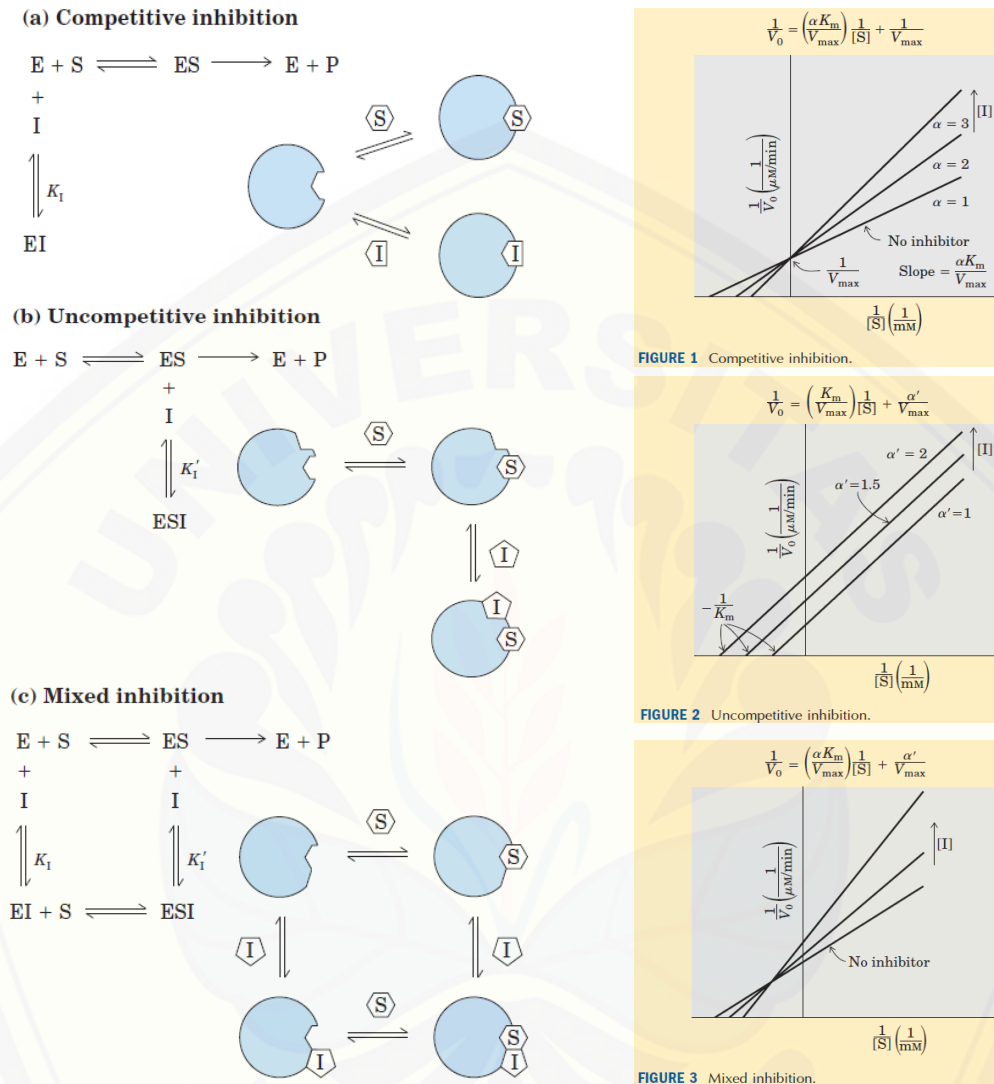
Plot antara $1/[S]$ dan $1/v_0$ dari persamaan ini akan menghasilkan suatu kurva linier yang ditunjukkan pada gambar 2.22.



Gambar 2.22 Plot Lineweaver-Burk

Secara umum inhibisi terbagi menjadi dua jenis yaitu *reversible* dan *irreversible*. Inhibisi *irreversible* pada umumnya disebabkan oleh terjadinya proses destruksi atau modifikasi sebuah gugus fungsi atau lebih yang terdapat pada molekul enzim, contohnya terbentuknya ikatan kovalen antara enzim dengan inhibitor. Sedangkan inhibisi *reversible* terbagi menjadi tiga tipe yaitu kompetitif, ankompetitif, dan campuran keduanya (Nelson & Cox, 2008).

Inhibisi kompetitif terjadi karena adanya kompetisi antara inhibitor dengan substrat untuk mendapatkan sisi aktif enzim. Ketika kompleks enzim-inhibitor (EI) terbentuk maka akses substrat ke bagian sisi aktif enzim terhambat sehingga produk tidak dihasilkan. Oleh karena itu, struktur kebanyakan inhibitor kompetitif cenderung mirip dengan struktur substrat. Tipe inhibisi ini dapat disiasati dengan meningkatkan konsentrasi substrat. Untuk inhibisi ankompetitif dan campuran hanya ditemukan pada enzim yang memiliki dua substrat atau lebih. Inhibitor ankompetitif membentuk ikatan dengan enzim pada tempat yang berbeda dari substrat setelah kompleks enzim-substrat (ES) terbentuk dan sebagai hasilnya terbentuk kompleks enzim-substrat-inhibitor (ESI). Sedangkan inhibisi campuran merupakan kombinasi dari inhibisi kompetitif dan ankompetitif. Untuk menentukan apakah suatu inhibisi termasuk tipe kompetitif, ankompetitif, atau campuran, maka digunakan kurva Lineweaver-Burk karena masing-masing tipe inhibisi memiliki karakteristik plot yang berbeda (Nelson & Cox, 2008). Tiga tipe penghambatan reversibel enzim dilengkapi dengan bentuk kurva Lineweaver-Burk dan persamaan matematisnya ditunjukkan pada Gambar 2.22



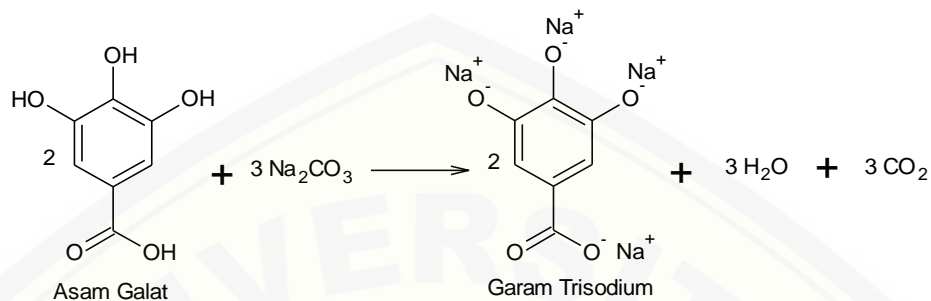
Gambar 2.23 Tiga tipe penghambatan enzim secara reversibel (Nelson & Cox, 2008).

2.9 Prinsip Analisis Kandungan Fenolik

2.9.1 Analisis Total Fenolik

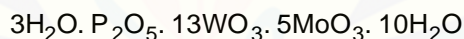
Analisis total fenolik didasarkan pada kemampuan senyawa fenolik mereduksi reagen Folin-Ciocalteu (FC) dan pengukurannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Senyawa fenolik yang biasa digunakan sebagai standar dalam analisis ini adalah asam galat. Asam galat akan bereaksi dengan natrium karbonat menghasilkan

ion fenolat yaitu garam *trisodium* (Rayner & Raynel, 2011). Persamaan reaksinya ditampilkan pada Gambar 2.24 berikut.



Gambar 2.24 Reaksi pembentukan ion fenolat dari asam galat

Ion fenolat yang terbentuk akan mereduksi reagen FC yang berwarna kuning menghasilkan senyawa baru yang berwarna biru yang memiliki panjang gelombang maksimum 750 nm. Reagen FC sendiri merupakan campuran fosfomolibdat dan fosfotungstat dengan dua komposisi yang berbeda (Swamy *et al.*, 2014). Berikut adalah komposisi reagen Folin-Ciocalteu:

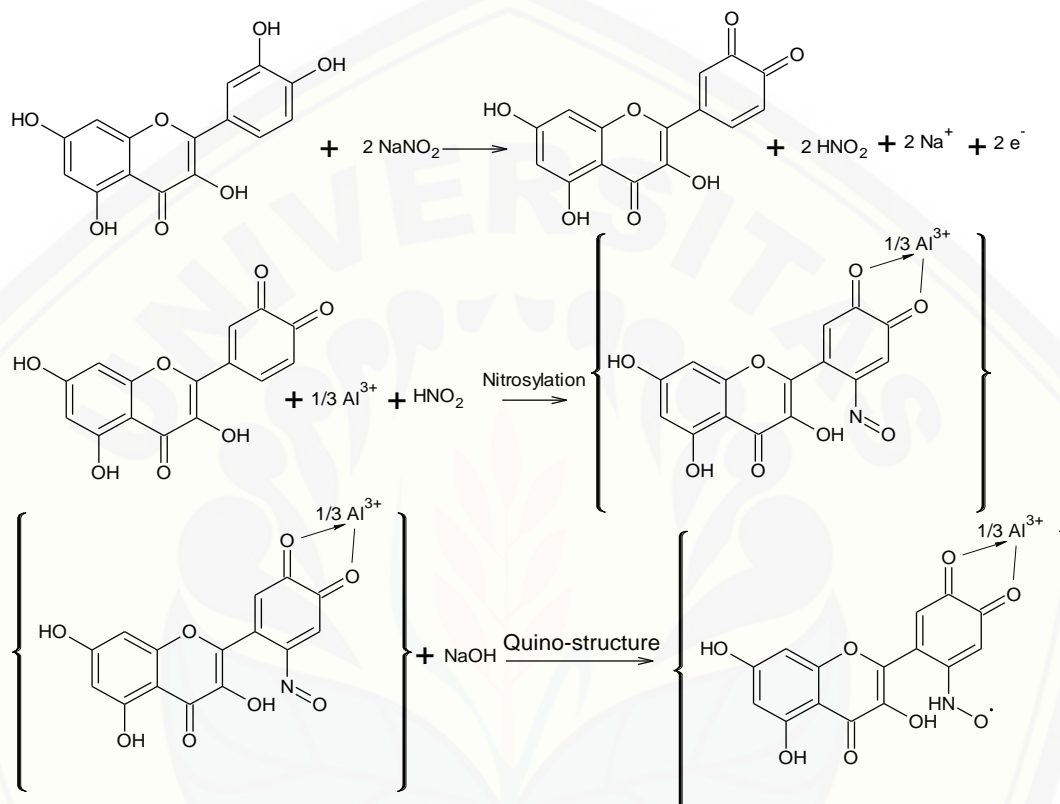


2.9.2 Analisis Total Flavonoid

Analisis total flavonoid didasarkan pada pembentukan kompleks antara gugus katekol dengan logam Aluminium yang menghasilkan warna. Senyawa flavonoid yang biasa digunakan sebagai standar dalam analisis ini adalah Kuersetin karena memiliki gugus katekol (*orto*-dihidroksibenzena).

Gugus katekol kuersetin pada cincin B akan dioksidasi menjadi keton oleh natrium nitrit, sementara natrium nitrit sendiri tereduksi menjadi asam nitrit. Gugus keton yang telah terbentuk akan mengompleks dengan kation aluminium (Al^{3+}) yang berasal dari AlCl_3 dan dilanjutkan dengan nitrosilasi oleh asam nitrit. Senyawa tersebut kemudian direduksi oleh natrium hidroksida yang menghasilkan struktur quino. Tiga senyawa kuersetin akan mengompleks dengan satu logam aluminium

membentuk struktur quino yang berwarna kuning yang memiliki panjang gelombang maksimum 415 nm (Zhu *et al.*, 2009). Mekanisme pembentukan kompleks kuersetin dengan alumunium ditunjukkan pada Gambar 2.25 berikut.

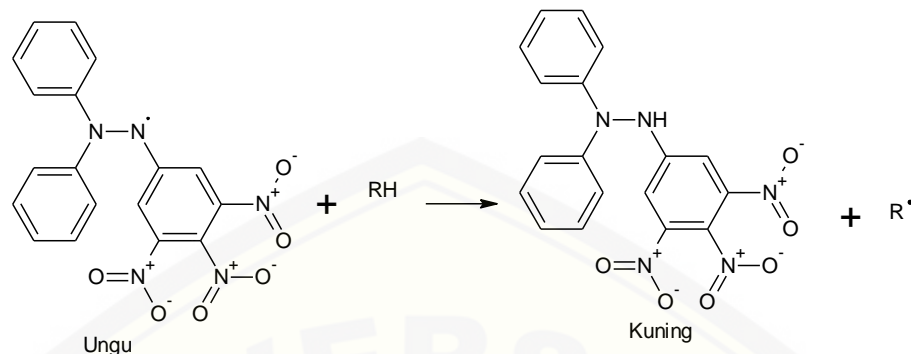


Gambar 2.25 Reaksi pembentukan kompleks berwarna dari kuersetin

2.10 Prinsip Analisis Antioksidan

2.10.1 Analisis Peredaman Radikal DPPH

Analisis peredaman radikal DPPH didasarkan pada kemampuan senyawa fenolik mereduksi radikal buatan DPPH yang sifatnya lebih stabil daripada radikal alami. Senyawa fenolik akan mereduksi radikal DPPH menjadi *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine* (DPPH-H) yang berwarna kuning. Panjang gelombang maksimum radikal DPPH dalam metanol adalah 515 nm (Soler-Rivas *et al.*, 2000). Reaksi antara radikal DPPH dengan suatu antioksidan ditunjukkan pada Gambar 2.26 berikut.

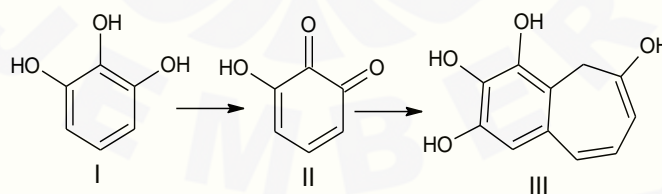


Gambar 2.26 Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan

Analisis ini dilakukan secara Spektrofometri. Semakin tinggi konsentrasi dan semakin reaktif senyawa fenolik, maka semakin banyak molekul DPPH yang dapat direduksi sehingga menyebabkan terjadinya penurunan absorbansi. 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 DPPH. Menurut Hyun *et al.* (2013).

2.10.2 Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida

Analisis peredaman radikal anion superoksida secara spektrofotometri didasarkan pada reaksi autooksidasi pirogalol. Reaksi autooksidasi pirogalol ditunjukkan pada Gambar 2.27 berikut (Tauber, 1953).

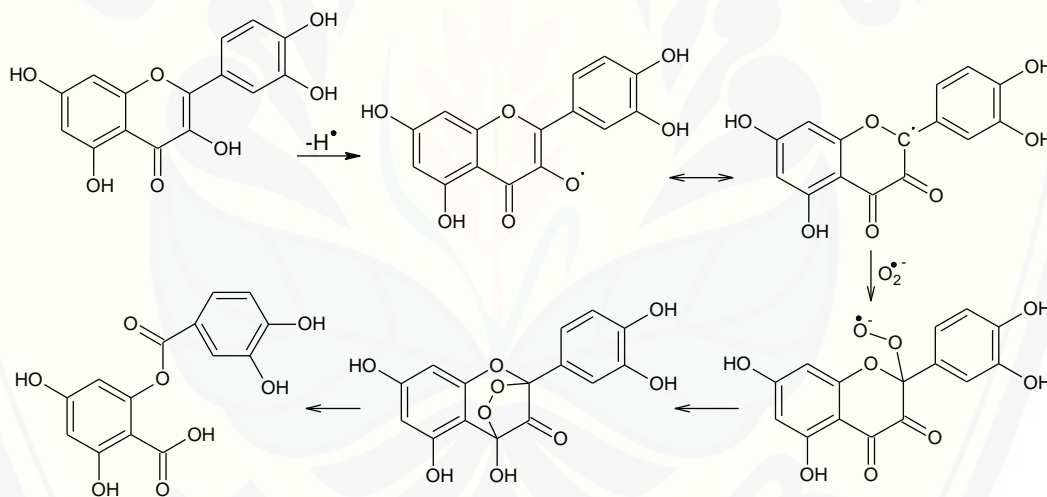


Gambar 2.27 Reaksi autooksidasi pirogalol

Pirogalol (I) merupakan senyawa yang tidak berwarna. Pada kondisi basa senyawa tersebut mengalami autooksidasi menghasilkan radikal anion superoksida dan ortoquinon (II). Ortoquinon yang 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 tersebut yang mengoksidasi ortoquinon menjadi purpurogalin.

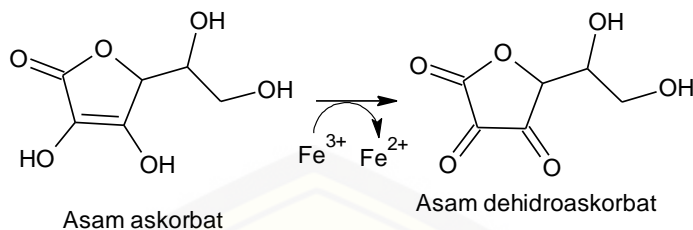
Keberadaan antioksidan seperti golongan senyawa fenolik akan menurunkan laju pembentukan purpurogalin karena radikal anion superoksida bereaksi dengan antioksidan tersebut sehingga nilai *slope* menurun. Mekanisme reaksi senyawa fenolik dalam meredam radikal anion superoksida mungkin bermacam-macam. Salah satu contoh reaksi kuersetin dengan radikal anion superoksida ditunjukkan pada Gambar 2.28 berikut (Nimse & Pal, 2015).



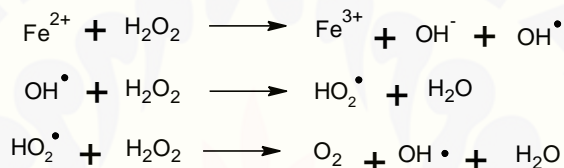
Gambar 2.28 Mekanisme reaksi peredaman radikal anion superoksida oleh kuersetin

2.10.3 Analisis Peredaman Radikal Hidroksil

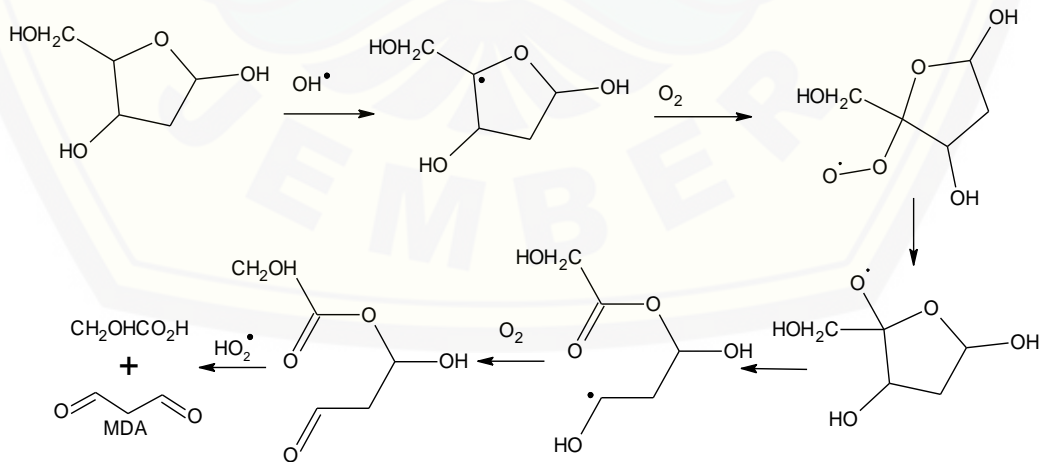
Radikal hidroksil dihasilkan melalui reaksi Fenton pada sistem yang terdiri atas Fe^{3+} -asam askorbat-EDTA- H_2O_2 (Gutteridge & Halliwell, 1988). Ion Fe^{3+} yang membentuk kompleks dengan EDTA akan direduksi oleh asam askorbat menjadi ion Fe^{2+} . Reaksi reduksi ion Fe^{3+} oleh asam askorbat ditunjukkan pada Gambar 2.29.

Gambar 2.29 Reaksi reduksi ion Fe^{3+} oleh asam askorbat

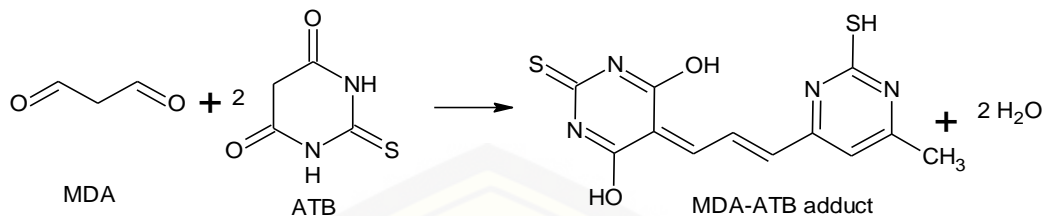
Ion Fe^{2+} yang terbentuk akan dioksidasi oleh H_2O_2 melalui reaksi Fenton sehingga menghasilkan radikal hidroksil. Berikut ini adalah reaksi Fenton yang menghasilkan radikal hidroksil.



Radikal hidroksil yang terbentuk akan menyerang 2-deoksi-D-ribosa dan menghasilkan produk campuran (Gambar 2.30). Malondialdehida (MDA) merupakan salah satu produknya yang kemudian bereaksi dengan asam 2-tiobarbiturat (ATB) membentuk MDA-ATB *adduct*. Senyawa MDA-ATB *adduct* memiliki warna merah muda dengan panjang gelombang maksimum 532 nm. Reaksi pembentukan MDA-ATB *adduct* ditunjukkan pada Gambar 2.31 berikut.

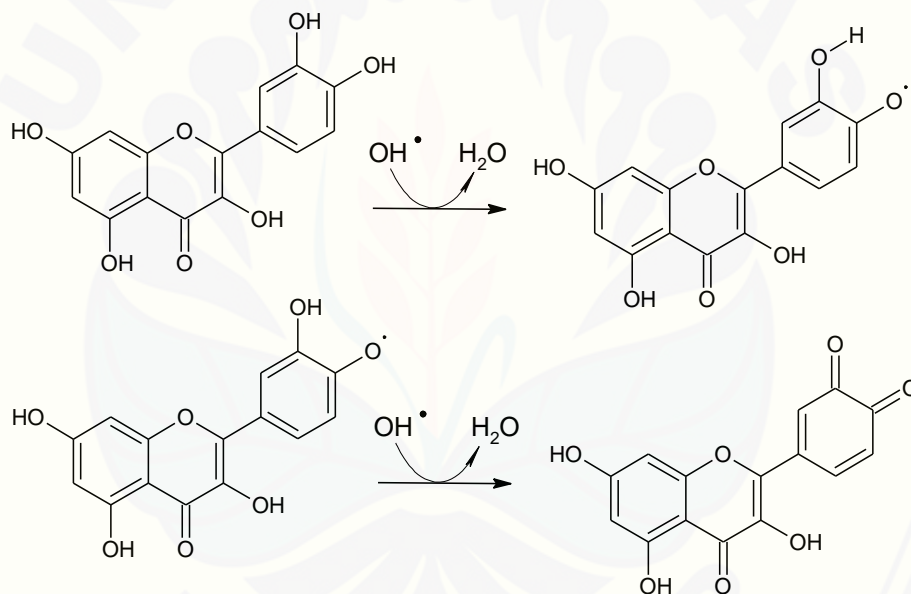


Gambar 2.30 Reaksi radikal hidroksil dengan 2-deoksi-D-ribosa



Gambar 2.31 Reaksi pembentukan MDA-ATB *adduct* yang berwarna merah muda

Keberadaan antioksidan seperti senyawa flavonoid mampu meredam radikal hidroksil dengan berbagai cara. Salah satu contoh mekanisme peredaman radikal hidroksil oleh kuersetin ditunjukkan pada Gambar 2.32 berikut (Bubols *et al.*, 2013).



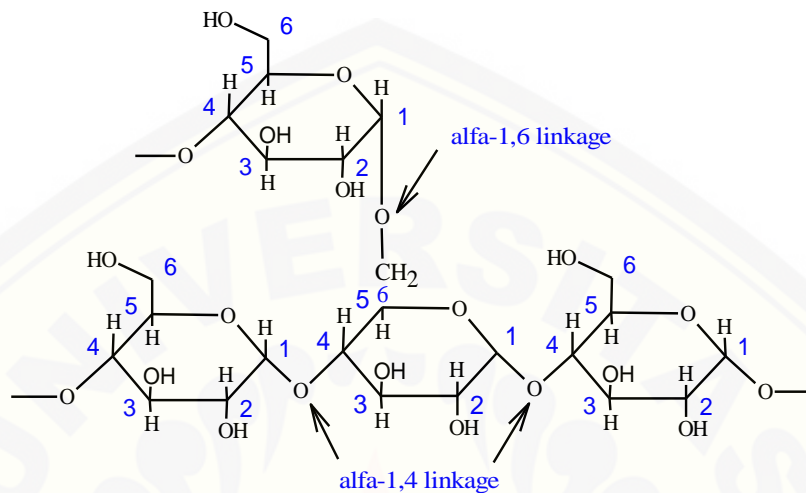
Gambar 2.32 Mekanisme reaksi peredaman radikal hidroksil oleh kuersetin

2.11 Prinsip Analisis Inhibisi Enzim

2.11.1 Analisis Inhibisi α -Amilase

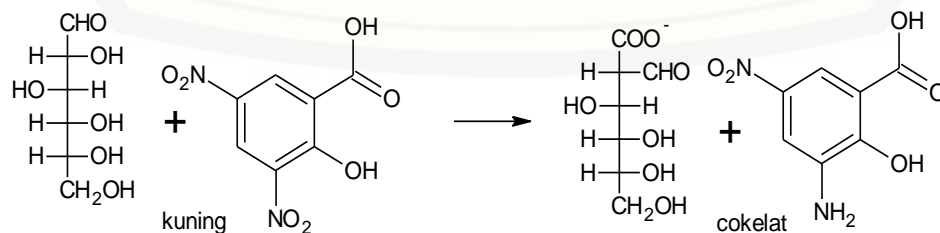
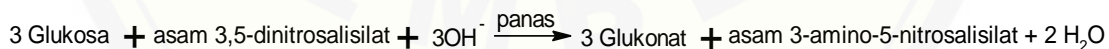
Analisis inhibisi α -amilase didasarkan pada penurunan gula reduksi hasil reaksi hidrolisis pati terlarut oleh α -amilase dengan adanya senyawa inhibitor. Pati terlarut akan dihidrolisis oleh α -amilase menjadi gula reduksi oligosakarida yang

lebih pendek melalui pemutusan ikatan α -D-(1-4) glikosida (Sales *et al.*, 2012). Struktur pati (amilum) ditunjukkan pada Gambar 2.33.



Gambar 2.33 Struktur Amilum

Reaksi hidrolisis α -amilase dapat dihentikan dengan pemanasan. Pemanasan menyebabkan perubahan konfigurasi dari α -amilase sehingga aktivitasnya hilang. Konsentrasi produk hidrolisis setelah reaksinya dihentikan dapat ditentukan menggunakan reagen pewarna asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Reagen DNS akan direduksi oleh setiap gula reduksi yang terdapat dalam larutan sehingga produk campuran tersebut dapat ditentukan konsentrasinya. Senyawa asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang dihasilkan dari reaksi tersebut memiliki warna oranye gelap dengan panjang gelombang maksimum 540 nm. Reaksi reduksi DNS oleh salah satu gula reduksi yaitu glukosa ditunjukkan pada Gambar 2.34 berikut.

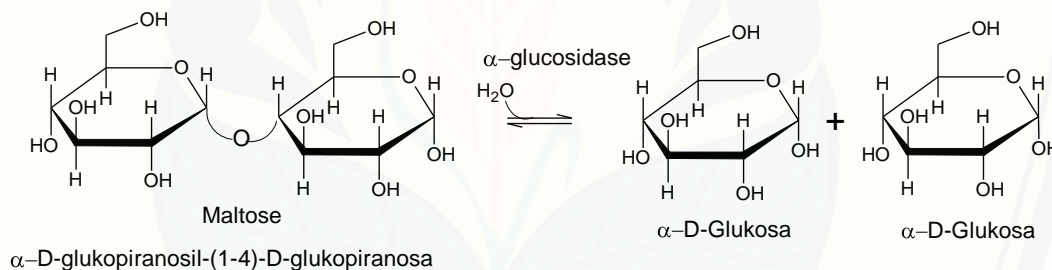


Gambar 2.34 Reaksi reduksi DNS dengan gula pereduksi (Timerman, Tanpa Tahun)

Keberadaan senyawa inhibitor tertentu dapat menghambat aktivitas α -amilase, menyebabkan substrat tidak dapat bereaksi dengan enzim sehingga produk tidak dapat terbentuk. Akibatnya, terjadi penurunan absorbansi pada panjang gelombang maksimumnya. Semakin kecil absorbansi maka semakin besar persen penghambatannya, dan menandakan semakin baik potensinya sebagai inhibitor untuk α -amilase.

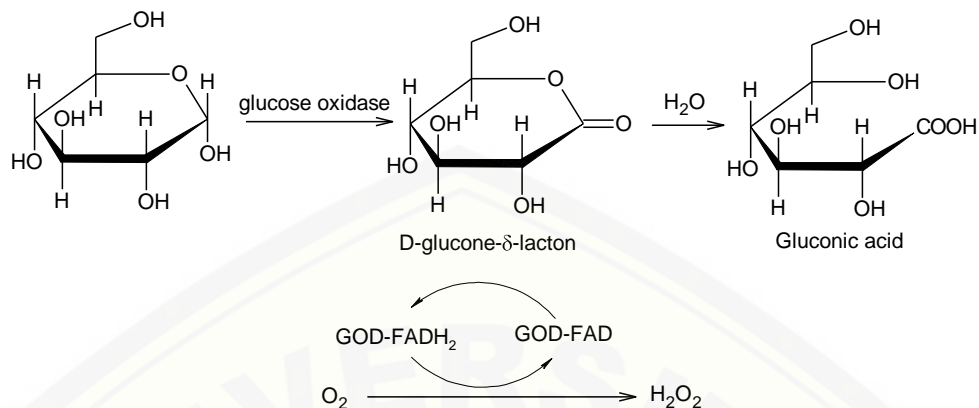
2.11.2 Analisis Inhibisi α -Glukosidase

Analisis penghambatan α -glukosidase didasarkan pada penurunan produk reaksi (glukosa) ketika ditambahkan inhibitor. Maltosa dapat digunakan sebagai substrat yang akan dihidrolisis oleh α -glukosidase menjadi dua unit glukosa (Miyazawa *et al.*, 2005). Reaksi hidrolisis maltosa oleh α -glukosidase ditunjukkan pada Gambar 2.35 berikut.



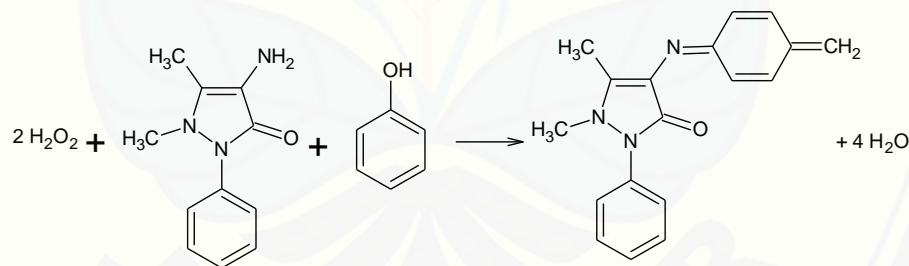
Gambar 2.35 Reaksi hidrolisis maltosa oleh α -glukosidase

Glukosa yang dihasilkan dari reaksi tersebut dapat ditentukan konsentrasinya dengan metode spektrofotometri. Pertama, glukosa direaksikan dengan glukosa oksidase untuk menghasilkan asam glukonat dan hidrogen peroksida (Gambar 2.36). Glukosa oksidase merupakan enzim flavoprotein dengan oksigen sebagai akseptor elektronnya. FAD yang merupakan kofaktornya akan direduksi menjadi FADH_2 selama reaksi oksidasi glukosa berlangsung (Bankar *et al.*, 2009).



Gambar 2.36 Reaksi oksidasi glukosa oleh glukosa oksidase

Hidrogen peroksida yang dihasilkan dari reaksi diatas direaksikan dengan 4-aminoantipirin (AmNH_2), fenol (PhOH), dan *horseradish peroxidase* (HRP) untuk menghasilkan kompleks yang berwarna (Vinodu & Padmanabhan, 2001). Enzim ini memiliki residu katalitik His⁴² yang mengoksidasi substratnya. Produk dari reaksi ini menghasilkan *quinoneimine* yang berwarna merah muda dan memiliki panjang gelombang maksimum 500 nm.



Gambar 2.37 Reaksi oksidasi hidrogen peroksida oleh *horseradish peroxidase*

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2015 sampai September 2015 di Laboratorium *Center for Development of Advance Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

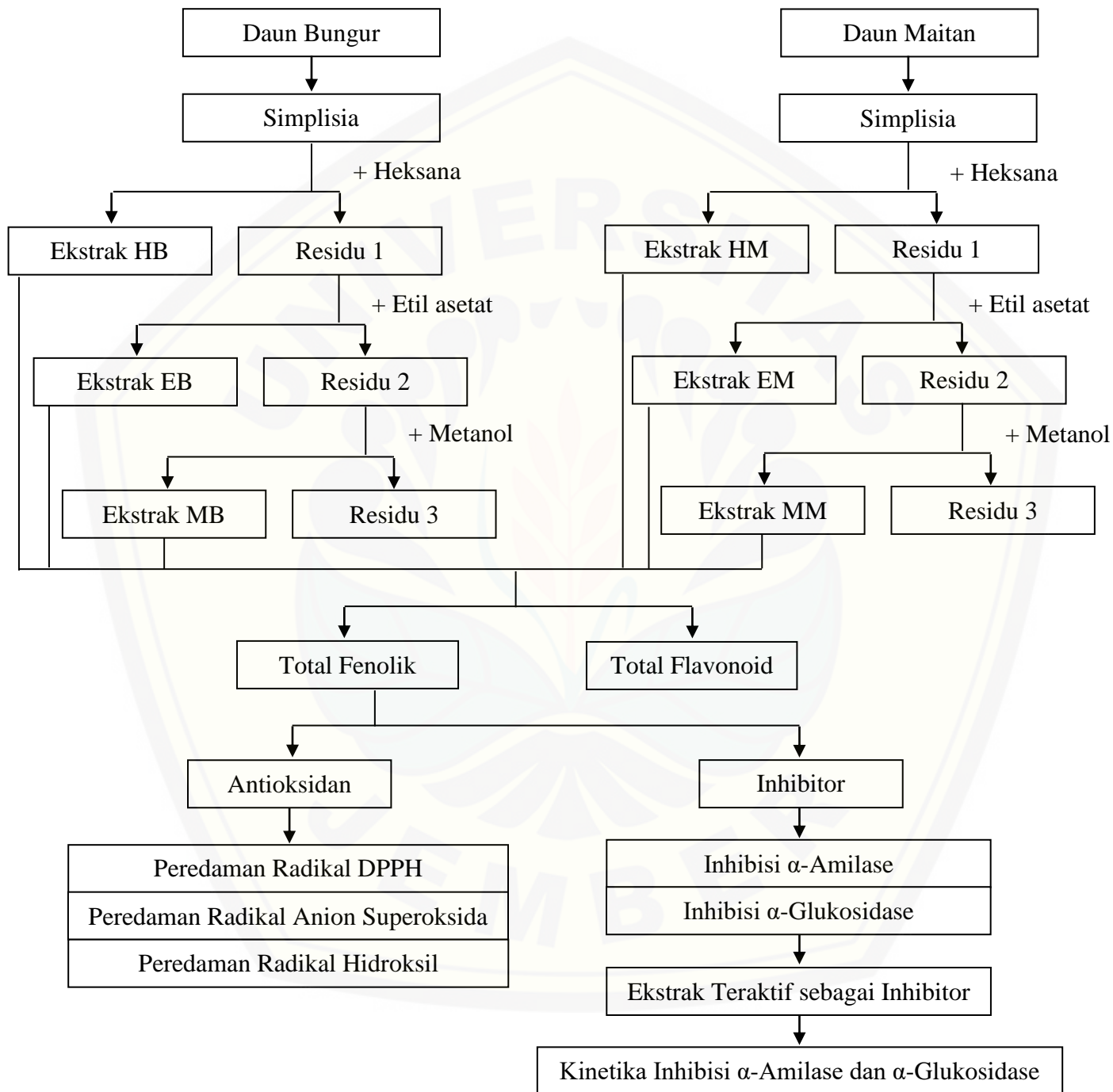
Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini digolongkan menjadi peralatan gelas, bukan gelas, dan instrumen. Peralatan gelas seperti tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur, gelas beker. Peralatan bukan gelas antara lain gunting, ayakan, plastik sampel, kertas label, kertas saring, alumunium foil, dan tabung mikro. Peralatan instrumen meliputi blender, timbangan analitik, evaporator vakum, corong Buchner, pendingin, pipet mikro, inkubator, satu set alat spektrofotometer UV-Vis, *shaker*, *96-well plates*, *microplate reader*, dan sentrifugator.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: daun Bungur (*Lagerstroemia speciosa*); daun Maitan (*Lunasia amara* Blanco); heksana (Merck); etil asetat (Merck); metanol (Merck); akuades; reagen Folin-Ciocalteu (Merck); natrium karbonat (Merck); asam galat (Sigma-Aldrich); natrium nitrit (Merck); alumunium(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 (Merck); asam 2-tiobarbiturat (Merck); pirogalol (Sigma-Aldrich); Trizma-base (nacalai tasque); asam klorida (Merck); sukrosa (Merck); dimetilsulfoksida (Merck); natrium hidrogenfosfat (nacalai tasque); peroksidase (Sigma-Aldrich); α -glukosidase (Sigma-Aldrich); glukosa oksidase (Sigma-Aldrich); 4-aminoantipirin (Sigma-Aldrich); fenol (Sigma-Aldrich); natrium klorida (Merck); Kalium natrium tartrat (Merck); *Soluble starch* (Merck); asam 3,5-dinitrosalisilat (Merck); α -amilase (Sigma-Aldrich); kalium hidrogenfosfat (Merck); triton x-100 (Sigma-Aldrich); dan akarbosa (Glucobay).

3.3 Rancangan Diagram Alir Penelitian



3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 *Sampling*

Pengambilan sampel daun Bungur dan Maitan dilakukan di Taman Nasional Meru Betiri Jember. Membawa peralatan yang dibutuhkan seperti gunting tanaman dan pisau, serta wadah sampel. Sampel yang didapat dimasukkan dalam wadah sampel dan diberi label sesuai dengan nama tanaman, kemudian divalidasi oleh Lembaga Taman Nasional Meru Betiri.

3.4.2 Pembuatan Simplisia Daun Bungur dan Maitan

Daun Bungur dan Maitan dikeringkan di dalam ruangan pada suhu ruang selama beberapa hari untuk mengurangi kadar air. Sampel yang sudah kering disortir untuk memisahkan sampel yang kondisinya masih bagus dengan sampel yang sudah membusuk. Sampel terpilih kemudian dihaluskan dengan cara diblender hingga menjadi serbuk dan diseragamkan ukurannya dengan ayakan 60 mesh.

3.4.3 Ekstraksi Simplisia Daun Bungur dan Maitan

Ekstraksi bioaktif dari simplisia daun Bungur dan Maitan dilakukan dengan metode maserasi. Ekstraksi dilakukan secara bertingkat dengan tiga jenis pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu heksana, etil asetat, dan metanol. Ekstraksi dimulai dari pelarut yang non polar, yaitu heksana. Rasio jumlah simplisia dan pelarut yang digunakan adalah 1:5 (*w/v*). Sebanyak 50 gram simplisia daun Bungur dan Maitan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 mL yang berbeda kemudian masing-masing ditambahkan 250 mL pelarut heksana. Selanjutnya dilakukan pengadukan (*shaker*) selama 72 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 150 rpm. Setelah itu disaring menggunakan corong vakum sehingga dihasilkan filtrat dan residu 1. Filtrat dievaporasi menggunakan evaporator vakum pada suhu 40°C sehingga didapat ekstrak heksana Bungur (HB) dan heksana Maitan (HM). Residu 1 dari Bungur dan Maitan dibiarkan mengering selama sehari semalam. Setelah kering, residu 1 diekstrak kembali dengan menambahkan 250 mL pelarut etil asetat dengan cara yang

sama seperti sebelumnya sehingga didapat ekstrak etil asetat Bungur (EB) dan etil asetat Maitan (EM) serta residu 2. Residu 2 diekstrak lagi dengan cara yang sama setelah kering dengan menambahkan 250 mL pelarut metanol sehingga didapat ekstrak metanol Bungur (MB) dan metanol Maitan (MM) serta residu 3. Ekstrak HB, EB, MB, HM, EM, dan MM ditimbang untuk menghitung massa ekstrak yang diperoleh. Massa masing-masing ekstrak dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Massa ekstrak} = (\text{massa labu} + \text{ekstrak}) - \text{massa labu kosong} \quad (\text{Persamaan 3.1})$$

Kemudian masing-masing ekstrak dilarutkan dalam metanol dan disimpan dalam pendingin untuk analisis selanjutnya.

3.4.4 Analisis Total Fenolik Ekstrak Daun Bungur dan Maitan

Penentuan kandungan total fenolik menggunakan metode yang dikemukakan oleh Taga *et al.* (1984) dan dihitung menggunakan standar asam galat. Sebanyak 50 μL ekstrak HB, EAB, MB, HM, EAM, dan MM dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Sebanyak 1 mL Na_2CO_3 2%, (w/v) ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi dan diinkubasi selama 2 menit. Selanjutnya ditambahkan 50 μL reagen Folin-Ciocalteu 50% (v/v) 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.

3.4.5 Analisis Total Flavonoid Ekstrak Daun Bungur dan Maitan.

Penentuan kandungan total flavonoid menggunakan metode yang dikemukakan oleh Chang *et al.* (2002) yang dihitung berdasarkan standar kuersetin. Sebanyak 150 μL masing-masing ekstrak ditambahkan dengan 400 μL akuades. Larutan ini ditambahkan dengan 30 μL NaNO_2 5% (w/v) dan diinkubasi selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 30 μL AlCl_3 10% (w/v) dan diinkubasi lagi selama 6 menit. Setelah itu ditambahkan 200 μL NaOH 1 M dan 240 μL akuades. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 415 nm. Total flavonoid masing-masing

ekstrak ditentukan dalam mg kuersetin *equivalent* (KE) per gram ekstrak menggunakan persamaan dari kurva standar kuersetin.

3.4.6 Uji Aktivitas Antioksidan

a. Analisis Peredaman Radikal DPPH oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan

Analisis peredaman radikal DPPH mengacu pada metode yang dikemukakan Soler-Rivas *et al.* (2000). Sebanyak 200 μL ekstrak dengan 5 konsentrasi yang berbeda untuk masing-masing ekstrak dimasukkan ke dalam 96-well plates. Setelah itu, ditambahkan 100 μL reagen DPPH 90 μM (dalam metanol) dan diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan *Microplate reader* pada panjang gelombang 515 nm setelah 30 menit inkubasi. Persen peredaman radikal DPPH pada masing-masing konsentrasi ekstrak dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Persen peredaman} = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3.2})$$

A_0 adalah absorbansi kontrol dan A_1 adalah absorbansi ekstrak. Kontrol adalah larutan uji tanpa sampel. Hasil perhitungan persen peredaman pada tiap-tiap konsentrasi digunakan untuk membuat kurva linier dengan memplotkan persen peredaman dan log konsentrasinya. Persamaan linier yang dihasilkan adalah $y = mx + c$ dan persamaan tersebut digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} masing-masing ekstrak dengan persamaan berikut:

$$\text{IC}_{50} = \frac{50 - c}{m} \quad (\text{Persamaan 3.3})$$

Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi ekstrak yang dibutuhkan untuk menurunkan 50% aktivitas DPPH. Vitamin C digunakan sebagai standar.

b. Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan.

Analisis peredaman radikal anion superoksida mengacu pada metode yang dikemukakan Tang *et al.* (2010). Sebanyak 150 μL larutan ekstrak dicampur dengan 1,75 mL buffer Tris-HCL 50 mM (pH 8,2). Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit, kemudian ditambahkan 100 μL pirogalol 10 mM (dilarutkan dalam HCl 10 mM). *Slope* reaksi autooksidasi pirogalol selama 4 menit reaksi ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 320 nm. Persen peredaman radikal anion superoksida dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Persen Peredaman} = \left[\frac{S_0 - S_1}{S_0} \right] \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3.4})$$

S_0 adalah *slope* kontrol dan S_1 adalah *slope* ekstrak. Vitamin C digunakan sebagai standar.

c. Analisis Peredaman Radikal Hidroksil oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan.

Analisis peredaman radikal hidroksil mengacu pada metode yang dikemukakan Halliwell dan Gutteridge (1987). Larutan yang terdiri atas 50 μL 2-deoksi-D-ribosa 28 mM (dalam buffer fosfat 20 mM; pH 7,4), 150 μL ekstrak, 100 μL EDTA 1 mM, 100 μL FeCl_3 10 mM, 50 μL H_2O_2 1 mM, dan 50 μL asam askorbat 1 mM dimasukkan dalam tabung mikro yang berbeda untuk masing-masing ekstrak lalu divortex. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu, ditambahkan 500 μL asam tiobarbiturat 1% dan 500 μL asam trikloroasetat 2,8%. Larutan divortex dan diinkubasi lagi selama 20 menit pada suhu 100 °C untuk menghasilkan warna merah muda. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 532 nm setelah larutan dingin. Persen peredaman radikal hidroksil dihitung dengan persamaan 3.2. Vitamin C digunakan sebagai standar positif.

3.4.7 Uji Aktivitas Inhibitor

a. Analisis Inhibisi α -Amilase Oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan.

Analisis penghambatan α -amilase dilakukan berdasarkan metode Hashim *et al.* (2013) yang dimodifikasi. Sebanyak 100 μL ekstrak dimasukkan ke dalam dua tabung mikro yang diberi label S^+ dan S^- . Sebagai kontrol, 100 μL DMSO juga dimasukkan ke dalam dua tabung mikro yang diberi label C^+ dan C^- . Sebagai standar 100 μL akarbosa dimasukkan ke dalam dua tabung mikro yang diberi label A^+ dan A^- . Tabung mikro yang berlabel S^+ , C^+ , dan A^+ ditambahkan 150 μL α -amilase (0,1 u/mL) sedangkan yang berlabel S^- , C^- , dan A^- ditambahkan 150 μL buffer fosfat pH 6,9. Larutan di prainkubasi selama 15 menit pada 37°C setelah divortex. Setelah itu, ditambahkan 250 μL *soluble starch* 1% (w/v) ke dalam semua tabung mikro. Larutan diinkubasi selama 15 menit pada 37°C setelah divortex. Reaksi hidrolisis dihentikan dengan mendidihkan selama 1 menit. Setelah dingin, larutan disaring menggunakan silika lalu diambil 160 μL dari masing-masing tabung mikro kemudian dimasukkan ke tabung mikro lain dengan label yang sama. Sebanyak 80 μL reagen DNS ditambahkan ke dalam tiap-tiap tabung mikro lalu dididihkan selama 15 menit. Setelah itu diencerkan dengan 720 μL akuades dan dipipet 200 μL ke dalam 96-well plates untuk diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 540 nm. Persen penghambatan α -amilase pada masing-masing ekstrak dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Persen inhibisi} = \left(\frac{(C^+ - C^-) - (S^+ - S^-)}{(C^+ - C^-)} \right) \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3.5})$$

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.

b. Analisis Inhibisi α -Glukosidase Oleh Ekstrak Daun Bungur dan Maitan.

Analisis penghambatan α -glukosidase dilakukan dengan mengacu pada metode yang dikemukakan Miyazawa *et al.* (2005) yang dimodifikasi. Sebanyak 100

μL maltosa 0,125 M dimasukkan ke dalam tabung mikro yang berlabel C^+ , C^- , S^+ , S^- , A^+ , dan A^- . Sebanyak 100 μL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung mikro S^+ dan S^- , sedangkan C^+ dan C^- ditambahkan dengan 100 μL DMSO, dan A^+ dan A^- ditambahkan dengan 100 μL Akarbosa. Setelah itu, 190 μL buffer fosfat pH 7 ditambahkan ke dalam setiap tabung mikro. Campuran divortex lalu ditambahkan 10 μL α -glukosidase (1 u/mL) ke dalam tabung mikro C^+ , S^+ , dan A^+ sedangkan C^- , S^- , dan A^- ditambahkan akuabides. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam setelah divortex. Reaksi dihentikan dengan mendidihkannya selama 3 menit. Setelah dingin, Campuran dikosmosil lalu diambil 235 μL dari masing-masing tabung mikro untuk dimasukkan ke tabung mikro lain dengan label yang sama. Sebanyak 750 μL buffer fenol pH 7 ditambahkan ke dalam setiap tabung mikro, dilanjutkan dengan penambahan 5 μL peroksidase (0,5 unit/ μL), 5 μL aminoantipirin (4 mg/mL), dan 5 μL glukosa oksidase (0,8 unit/ μL). Larutan divortex dan diinkubasi lagi selama 10 menit pada suhu 37 °C. Hasil inkubasi dipipet 200 μL dan dimasukkan ke dalam 96-well plates untuk diukur absorbansinya pada 500 nm dengan *microplate reader*. Persen penghambatan α -glukosidase dihitung dengan persamaan 3.5.

3.4.8 Uji Kinetika Inhibisi

a. Kinetika Inhibisi α -Amilase Oleh Ekstrak Teraktif sebagai Inhibitor.

Kinetika inhibisi α -amilase dianalisis dengan metode pada poin 3.4.7.a di atas tetapi ada variasi konsentrasi *soluble starch* dan waktu inkubasi. Konsentrasi *soluble starch* yang digunakan adalah 1%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; dan 0,0625%. Pada masing-masing konsentrasi *soluble starch* dilakukan variasi waktu inkubasi 0, 3, 6, 9, 12, 18, dan 21 menit untuk mendapatkan kecepatan awal reaksinya (V_0). Nilai V_0 didapat dari pengeplotan antara waktu reaksi dan konsentrasi produk reaksi yang dihasilkan. Konsentrasi produk dihitung dari persamaan kurva standar maltosa. Bentuk kurva hasil pengeplotan antara waktu inkubasi dan konsentrasi maltosa ditunjukkan pada Gambar 3.1. Nilai V_0 sama dengan kemiringan dari kurva tersebut.