



**STUDI *IN-VITRO* POTENSI ANTIOKSIDAN DAN ANTIDIABETIK DARI
EKSTRAK FENOLIK DAUN GARU (*Antidesma montanum*) DAN WUNI
(*Antidesma bunius*) ASAL TAMAN NASIONAL MERUBETIRI**

SKRIPSI

Oleh :

SUSILOWATI

NIM. 111810301030

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2015



**STUDI *IN-VITRO* POTENSI ANTIOKSIDAN DAN ANTIDIABETIK DARI
EKSTRAK FENOLIK DAUN GARU (*Antidesma montanum*) DAN WUNI
(*Antidesma bunius*) ASAL TAMAN NASIONAL MERUBETIRI**

SKRIPSI

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

Oleh :

Susilowati

NIM 111810301030

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Arbaiyah dan Ayah Alim tercinta, serta semua keluarga terima kasih atas doa, motivasi, perhatian dan kasih sayang yang tiada henti tcurahkan;
2. guru-guru di SDN Kregen an 1, SMPN 1 Pajarakan, dan SMAN 1 Kraksaan serta dosen-dosen di Jurusan Kimia FMIPA UNEJ yang telah memberikan ilmu, mendidik, dan membimbing dengan penuh kesabaran;
3. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

Jika engkau telah membuat ketetapan, maka bulatkan tekad mu. Sebab rusaknya pikiran adalah karena keraguan. *)

Bergiat ketika kamu malas, adalah ujian sejati terhadap karaktermu. **)

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

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

**) Covey, Sean. 2001. *7 Habbits of Highly Effective Teens*. Jakarta: Binarupa Aksara

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

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Susilowati

NIM : 111810301030

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Studi In-Vitro Potensi Antioksidan dan Antidiabetik dari Ekstrak Fenolik Daun Garu (*Antidesma montanum*) dan Wuni (*Antidesma bunius*) Asal Taman Nasional Merubetiri“ 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,

Susilowati

NIM 111810301030

SKRIPSI

**STUDI *IN-VITRO* POTENSI ANTIOKSIDAN DAN ANTIDIABETIK DARI
EKSTRAK FENOLIK DAUN GARU (*Antidesma montanum*) DAN WUNI
(*Antidesma bunius*) ASAL TAMAN NASIONAL MERUBETIRI**

Oleh
Susilowati
NIM 111810301030

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 “Studi In-Vitro Potensi Antioksidan dan Antidiabetik dari Ekstrak Fenolik Daun Garu (*Antidesma montanum*) dan Wuni (*Antidesma bunius*) Asal Taman Nasional Merubetiri” 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, SP., M.Agr., Ph.D
NIP. 197008101998031001

Penguji I,

Penguji II,

Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si
NIP. 197104301998031003

I Nyoman Adiwinata, S.Si., M.Si
NIP. 197105011998021002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Jember

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

RINGKASAN

Studi In-Vitro Potensi Antioksidan dan Antidiabetik dari Ekstrak Fenolik Daun Garu (*Antidesma Montanum*) dan Wuni (*Antidesma Bunius*) Asal Taman Nasional Merubetiri; Susilowati, 111810301030; 2015: 93 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit endokrin yang umum terjadi di seluruh dunia. Akumulasi glukosa darah yang berlebih pada penderita DM menyebabkan berbagai komplikasi karena glukosa dapat mengalami reaksi autooksidasi yang menghasilkan radikal bebas yang menyebabkan tubuh mengalami percepatan modifikasi lipid, DNA, dan protein di seluruh jaringan tubuh sehingga tubuh mengalami stress oksidatif. Terapi farmakologis menggunakan obat antidiabetik sintetis seperti akarbosa 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. Garu dan Wuni merupakan bahan baku obat tradisional yang tumbuh di kawasan Taman Nasional Meru Betiri. Potensi ekstrak fenolik dari Garu dan Wuni sebagai antidiabetik dan antioksidan dianalisis dalam penelitian ini.

Potensi ekstrak fenolik Garu dan Wuni 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 α -amilase dan α -glukosidase. Ekstrak yang memiliki persen penghambatan pada α -amilase dan α -glukosidase yang lebih tinggi pada konsentrasi yang sama dikatakan lebih berpotensi. Mekanisme penghambatan α -amilase dan α -glukosidase oleh senyawa aktif dalam ekstrak yang paling berpotensi sebagai antidiabetik dipelajari dari kinetika penghambatannya.

Hasil analisis antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak fenolik daun Garu dan Wuni berpotensi sebagai antioksidan dibandingkan dengan standar vitamin C. Ekstrak MG (metanol Garu) meredam aktivitas radikal anion superoksida, dan hidroksil tertinggi dibandingkan ekstrak HG (heksana garu) dan EG (etil asetat Garu). Ekstrak HG meredam radikal DPPH tertinggi dibandingkan dengan EG (etil asetat garu) dan MG (metanol Garu). Ekstrak MW (metanol Wuni) meredam aktivitas radikal DPPH, anion superoksida, dan hidroksil tertinggi dibandingkan dengan ekstrak HW (heksana Wuni) dan EW (etil asetat Wuni). Ekstrak fenolik daun Garu dan Wuni berpotensi sebagai antidiabetik meskipun dibawah akarbosa. Ekstrak EG (etil asetat garu) mampu menghambat aktivitas α -Amilase dibandingkan dengan HG (heksana garu) dan MG (metanol Garu). Sedangkan ekstrak HG (heksana Garu) mampu menghambat α -Glukosidase tertinggi dibandingkan ekstrak EG (etil asetat Garu) dan MG (metanol Garu). Ekstrak EW (etil asetat Wuni) mampu menghambat aktivitas α -Amilase dan α -Glukosidase tertinggi dibandingkan HW (heksana Wuni) dan MW (metanol Wuni). Ekstrak EW (etil asetat Wuni) menghambat α -amilase dan α -glukosidase secara kompetitif.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Studi In-Vitro Potensi Antioksidan dan Antidiabetik dari Ekstrak Fenolik Daun Garu (*Antidesma montanum*) dan Wuni (*Antidesma bunius*) Asal Taman Nasional Merubetiri”. 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 I Nyoman Adiwinata S.Si., M.Si., selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktunya guna menguji, serta memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
5. Novita Andarini, S.Si, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
6. bapak dan ibu dosen-dosen FMIPA terutama dosen-dosen Jurusan Kimia Universitas Jember yang telah memberikan ilmu pengetahuan;

7. keluarga tercinta, Ibunda Arbaiyah, Ayahanda Alim, Adik tercinta Riza Umami, dan seluruh keluarga besar yang setia mendukung baik moril dan materil, mendoakan, mendidik, dan memberi kasih sayang dan pengorbanan yang tiada henti.
8. teman-teman angkatan 2011 (SOLVENT), terima kasih atas semangat, bantuan, saran, perhatian, dan kenangan yang telah diberikan;
9. Mirham Nurul Hairunis, Okky Santi, Sarifatun Nahariyah, Marga Romadhona, Nehemia Fernandes K., M. Zainul A., Jainur Rochman, Lilik Duwi W., Robitha Kartikasari, Putu Irwan Y., Siti Aisyatus dan Aranca Nindya terima kasih atas doa, semangat dan perhatian yang diberikan selama ini;
10. teman-teman seperjuangan di CDAST, terima kasih atas saran, kerjasama dan bantuannya;
11. teman-teman kosan Blue Jail dan Puri Bidari yang tak bisa disebut satu per satu terima kasih atas semangat, perhatian dan kenangan yang tak kan terlupakan;
12. teman-teman pengurus HIMAKI periode 2013-2014 dan periode 2014-2015, terimakasih atas waktu, kerjasama dan bantuannya;
13. 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, November 2015

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

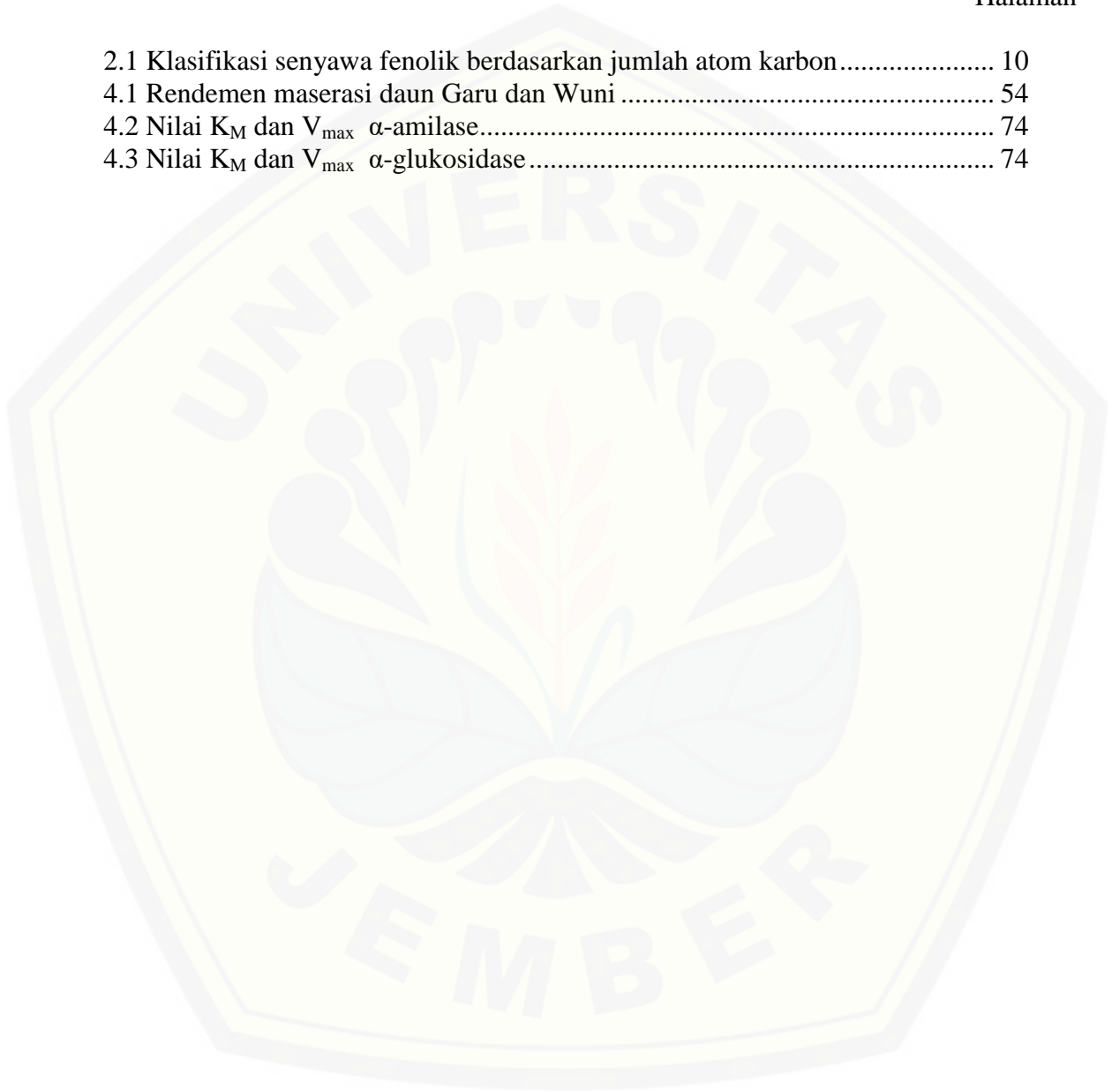
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xx
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Taman Nasional Merubetiri	6
2.2 Garu	7
2.3 Wuni	8
2.4 Senyawa Metabolit Sekunder: Fenolik	9
2.4.1 Flavonoid	10
2.4.2 Asam fenolat dan Senyawa yang Berhubungan Lain (Aldehid)	12
2.4.3 Fenilpropanoid dan Coumarins.....	13
2.4.4 Asetofenon dan Asam Fenilasetat.....	14
2.4.5 Kuinon	15
2.4.6 Lignan, Nolignan, dan Lignin	15
2.4.7 Tanin	16
2.5 Antioksidan	17
2.6 Simplisia, Ekstrak, dan Ekstraksi	19
2.6.1 Simplisia	19
2.6.2 Ekstrak	20
2.6.3 Ekstraksi	20

2.7 Diabetes Melitus	22
2.8 Mekanisme Penghambatan Aktivitas Enzim	27
2.9 Kinetika Penghambatan Enzim.....	28
2.10 Prinsip Analisis Antioksidan dan Antidiabetik.....	30
2.10.1 Analisis Total fenolik.....	30
2.10.2 Analisis Total Flavonoid.....	31
2.10.3 Analisis Kromatografi Lapis Tipis	33
2.10.4 Analisis Peredaman Radikal DPPH.....	34
2.10.5 Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida	35
2.10.6 Analisis Peredaman Radikal Hidroksil	36
2.10.7 Analisis Penghambatan α -Amilase.....	37
2.10.8 Analisis Penghambatan α -Glukosidase	38
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	42
3.1 Waktu dan Tempat.....	42
3.2 Alat dan Bahan.....	42
3.2.1 Alat Penelitian.....	42
3.2.2 Bahan Penelitian	42
3.3 Rancangan Penelitian	44
3.3.1 Diagram Alir Penelitian	44
3.4 Prosedur Pelaksanaan Penelitian	45
3.4.1 <i>Sampling</i>	45
3.4.2 Pembuatan Simplisia Daun Garu dan Wuni	45
3.4.3 Ekstraksi Fenolik dari Simplisia Daun Garu dan Wuni.....	45
3.4.4 Penentuan Kandungan Total Fenolik Ekstrak Daun Garu dan Wuni	46
3.4.5 Penentuan Kandungan Total Flavonoid Ekstrak Daun Garu dan Wuni	46
3.4.6 Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Daun Garu dan Wuni	46
3.4.7 Analisis Peredaman Radikal DPPH oleh Ekstrak Daun Garu dan Wuni	47
3.4.8 Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida oleh Ekstrak Daun Garu dan Wuni.....	47
3.4.9 Analisis Peredaman Radikal Hidroksil oleh Ekstrak Daun Garu dan Wuni	47
3.4.10 Analisis Penghambatan α -Amilase oleh Ekstrak Daun Garu dan Wuni	48
3.4.11 Kinetika Penghambatan α -Amilase oleh Ekstrak Daun Garu dan Wuni	49
3.4.12 Analisis Penghambatan α -Glukosidase oleh Ekstrak Daun Garu dan Wuni	50
3.4.13 Kinetika Penghambatan α -Glukosidase oleh Ekstrak	

Daun Garu dan Wuni	50
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	52
4.1 Randemen Maserasi Ekstrak Fenolik Daun Garu dan Wuni ...	52
4.2 Total Fenolik Ekstrak Daun Garu dan Wuni	55
4.3 Total Flavonoid Ekstrak Fenolik Daun Garu dan Wuni	56
4.4 Kromatogram Ekstrak Fenolik Daun Garu dan Wuni.....	58
4.5 Potensi Antioksidan Ekstrak Fenolik Daun Garu dan Wuni ...	60
4.5.1 Persentase Peredaman Radikal DPPH Oleh Ekstrak Fenolik Daun garu dan Wuni	61
4.5.2 Persentase Peredaman Radikal Anion Superoksida Oleh Ekstrak Fenolik Daun garu dan Wuni.....	62
4.5.3 Persentase Peredaman Radikal Hidroksil Oleh Ekstrak Fenolik Daun garu dan Wuni.....	64
4.5.4 Perbandingan Potensi Antioksidan	66
4.6 Potensi Antidiabetik Ekstrak Fenolik Daun Garu dan Wuni ...	67
4.6.1 Persentase Penghambatan α -Amilase Oleh Ekstrak Fenolik Daun garu dan Wuni	67
4.6.2 Persentase Penghambatan α -Glukosidase Oleh Ekstrak Fenolik Daun garu dan Wuni.....	69
4.6.3 Perbandingan Potensi Antidiabetik.....	70
4.6.4 Kinetika Penghambatan α -Amilase dan α -Glukosidase oleh Ekstrak Fenolik Etil Asetat Wuni	71
BAB 5. PENUTUP.....	76
5.1 Kesimpulan.....	76
5.2 Saran	76
DAFTAR PUSTAKA	77
LAMPIRAN.....	86

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Klasifikasi senyawa fenolik berdasarkan jumlah atom karbon.....	10
4.1 Rendemen maserasi daun Garu dan Wuni	54
4.2 Nilai K_M dan V_{max} α -amilase.....	74
4.3 Nilai K_M dan V_{max} α -glukosidase.....	74



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Fenol.....	9
2.2 Struktur kimia flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid	11
2.3 Jalur biosintesis flavonoid dan hubungan antarsenyawa	12
2.4 Struktur <i>Gallic acid</i> , <i>Protocatecheuic</i> , <i>Vanilin</i>	13
2.5 Struktur Asam p-koumarat, asam kafeat, p-koumaril aldehid, dan p-koumaril alkohol.....	13
2.6 Struktur Umbeliferon	14
2.7 Struktur 2-hidroksiasetofenon dan 2-hidroksifenilasetat	14
2.8 Contoh senyawa kuinon (Juglon dan Emodin)	15
2.9 Kelompok senyawa fenilpropana penyusun lignan.....	15
2.10 Struktur kimia tannin terkondensasi dan terhidrolisis.....	16
2.11 Reaksi BHA dan radikal bebas	19
2.12 Komplikasi diabetes	25
2.13 Tipe inhibisi enzim.....	28
2.14 Persamaan dan grafik persamaan <i>Lineweaver Burk</i>	29
2.15 Plot <i>Lineweaver Burk</i> untuk tiga tipe inhibisi.....	30
2.16 Reaksi pembentukan ion fenolat dari asam galat.....	31
2.17 Reaksi Pembentukan warna dari kuersetin	32
2.18 Interaksi asam p-koumarat dengan silica gel dan DPPH	33
2.19 Reaksi Radikal DPPH dengan antioksidan	34
2.20 Reaksi Autooksidasi Pirogallol.....	35
2.21 Reaksi reduksi ion Fe^{3+} oleh asam askorbat	36
2.22 Reaksi radikal hidroksil dengan 2-deoksi-D-ribosa.....	37
2.23 Reaksi pembentukan MDA-ATB <i>adduct</i> yang berwarna pink	37
2.24 Reaksi reduksi DNS dengan gula pereduksi	38
2.25 Reaksi hidrolisis maltose oleh α -Glukosidase	39
2.26 Reaksi oksidasi glukosa oksidase	39
2.27 Struktur 3D <i>horseradish peroxidase</i>	40
2.28 Reaksi oksidasi hydrogen peroksida oleh <i>horseradish peroxidase</i>	40
2.29 Mekanisme katalisis substrat oelh <i>horseradish peroxidase</i>	41
3.1 Kurva hasil pengeplotan antara waktu inkubasi dan konsentrasi produknya	49
3.2 Kurva hasil pengeplotan antara waktu inkubasi dan konsentrasi produknya	51
4.1 Daun Garu dan Wuni	53
4.2 Total fenolik ekstrak daun garu dan wuni.....	56
4.3 Struktur 3',4'-dihidroksiflavon	57
4.4 Total Flavonoid ekstrak daun garu dan wuni	58

4.5 Visualisasi KLT menggunakan reagen spesifik DPPH.....	59
4.6 Nilai IC ₅₀ Radikal DPPH ekstrak daun garu dan wuni	61
4.7 Persen peredaman radikal anion superoksida oleh ekstrak daun garu dan wuni.....	63
4.8 Persen peredaman radikal hidroksil oleh ekstrak daun garu dan wuni	65
4.9 Perbandingan peredaman radikal DPPH, anion superoksida, dan Hidroksil oleh ekstrak daun garu dan wuni.....	66
4.10 Persen penghambatan α -Amilase oleh ekstrak daun garu dan wuni.....	68
4.11 Persen penghambatan α -Glukosidase oleh ekstrak daun garu dan wuni	70
4.12 Perbandingan persen penghambatan α -amilase dan α -glukosidase oleh ekstrak daun garu dan wuni.....	71
4.13 Kurva <i>Lineweaver Burk</i> α -Amilase	73
4.14 Kurva <i>Lineweaver Burk</i> α -Glukosidase.....	73

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Validasi Tanaman Garu dan Wuni.....	86
2. Perhitungan Rendemen Maserasi.....	87
3. Konsentrasi Ekstrak untuk Analisis Total Fenolik dan Flavonoid	87
4. Kurva Standar <i>Gallic Acid</i> dan Total Fenolik Ekstrak.....	87
5. Kurva Standar quercetin dan Total Flavonoid Ekstrak	89
6. Nilai <i>Retardation factor</i> (Rf) setiap <i>Spot</i> Kromatogram KLT.....	90
7. Nilai IC_{50} Radikal DPPH	90
8. Persen Peredaman Radikal Anion Superoksida	93
9. Persen Peredaman radikal Hidroksil	94
10. Persen Penghambatan α -Amilase.....	95
11. Persen Penghambatan α -Glukosidase	96
12. Kurva Standar Maltosa dan Nilai V_0 α -Amilase	97
13. Kurva Standar Glukosa dan Nilai V_0 α -Glukosidase	98
14. Nilai K_M dan V_{max} α -Amilase dan α -Glukosidase	100

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit endokrin yang umum di seluruh dunia. Sekitar 173 juta orang di dunia menderita diabetes melitus. Menurut Funke dan Melzig (2006), jumlah penderita diabetes melitus akan dua kali lipat lebih banyak pada tahun 2030. Pada tahun 2000, Indonesia merupakan negara ke-empat terbesar di dunia yang masyarakatnya menderita penyakit diabetes melitus setelah India, China, dan USA (Wild *et al.*, 2004). Penyakit diabetes melitus berada pada peringkat ketiga sebagai penyakit yang menyebabkan kematian, setelah kanker dan kardiovaskular (Guo *et al.*, 2010). Penyakit kencing manis disebabkan oleh gangguan metabolik yang ditandai dengan tingginya kandungan gula darah (*hiperglikemia*) dan sekresi glukosa dalam urin akibat kekurangan jumlah insulin, efek kerja atau keduanya (Rabbani *et al.*, 1999).

Berbagai komplikasi dapat diakibatkan oleh rendahnya kontrol diabetes. Komplikasi tersebut antara lain berupa penyakit vaskular sistemik (percepatan aterosklerosis), penyakit jantung, penyakit mikrovaskular pada mata, dan kerusakan ginjal (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Luasnya komplikasi pada diabetes tampaknya berkorelasi dengan konsentrasi glukosa darah sehingga glukosa berlebih diduga menjadi penyebab utama kerusakan jaringan. Fenomena ini dapat disebabkan oleh kemampuan hiperglikemia secara *in vivo* dalam modifikasi oksidatif berbagai substrat. Menurut (Droge, 2002), hiperglikemia juga terlibat dalam proses pembentukan radikal bebas melalui autooksidasi glukosa dan glikasi enzimatis, serta aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif.

Pembentukan senyawa oksigen reaktif akibat hiperglikemia dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan. Modifikasi

molekuler pada berbagai jaringan tersebut mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan peningkatan produksi radikal bebas. Hal itu merupakan awal kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stress oksidatif (Nuttal, 1999). Kerusakan oksidatif tersebut dapat diatasi dengan pemberian antioksidan. Peningkatan suplai antioksidan yang cukup akan membantu pencegahan komplikasi klinis diabetes melitus.

Hiperglikemia *postprandial* berperan penting dalam perkembangan DM tipe 2 dan komplikasi yang terjadi. Penderita DM tipe 2 ini harus menghadapi terapi sepanjang hidupnya untuk mengontrol hiperglikemia dan mencegah terjadinya komplikasi (Tahrani & Barret, 2010). Pengontrolan kadar glukosa *postprandial* merupakan strategi penting dalam pencegahan DM tipe 2, sehingga dapat dilakukan melalui pendekatan terapeutik dengan menunda absorpsi glukosa. Penundaan tersebut dilakukan dengan cara menghambat enzim-enzim yang terlibat dalam reaksi hidrolisis karbohidrat seperti α -amilase dan α -glukosidase menggunakan inhibitor-inhibitornya. Enzim α -amilase merupakan enzim yang menghidrolisis polisakarida menjadi oligosakarida dan dekstrin yang dihidrolisis lebih lanjut oleh α -glukosidase di intestinal menjadi glukosa. Glukosa yang terbentuk akan diabsorb oleh epitelium intestinal dan masuk ke dalam sistem peredaran darah.

Saat ini telah banyak digunakan secara klinis beberapa inhibitor dari α -amilase dan α -glukosidase antara lain akarbose dan miglitol. Namun, penggunaan tersebut tentunya memberikan efek samping dan dapat meningkatkan komplikasi diabetes. Menurut Sudha (2011), efek samping yang utama dari tersebut pada gastrointestinal antara lain adalah kembung, mual, diare, dan flatulensi. Inhibitor alami yang berasal dari bahan alam dapat dimanfaatkan menjadi pendekatan terapi untuk mengobati hiperglikemia *postprandial* karena memiliki efek samping yang rendah dan harganya lebih terjangkau daripada obat antihiperglikemia sintetik.

Tanaman merupakan sumber yang kaya akan inhibitor α -amilase dan α -glukosidase serta antioksidan alami yang memiliki penghambatan aktivitas keduanya yang kuat, sehingga dapat digunakan untuk terapi hiperglikemia *postprandial* yang

efektif (Nguyen et al., 2010). Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian untuk menemukan inhibitor α -amilase dan α -glukosidase serta antioksidan alami yang berasal dari hasil ekstrak senyawa fenolik tanaman, yang nantinya digunakan sebagai alternatif obat antidiabetes. Tanaman yang berpotensi sebagai alternatif obat antidiabetes yaitu daun garu (*Antidesma montanum*) dan wuni (*Antidesme bunius*).

Garau (*Antidesma montanum*) merupakan salah satu tanaman yang terdapat di Taman Nasional Merubetiri Jember. yang merupakan tanaman satu famili dengan wuni juga salah satu tanaman yang terdapat di Taman Nasional Merubetiri Jember. *Antidesma montanum* mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, terpen, tannin, glikosida, dan saponin (Elya et al, 2012). Wuni (*Antidesma bunius*) yang merupakan tanaman satu famili dengan garau juga salah satu tanaman yang terdapat di Taman Nasional Merubetiri Jember. Pohon wuni tersebar di Asia Tenggara dan Australia, sedangkan di Jawa tumbuh liar di hutan. Kandungan dari tanaman ini tidak banyak diketahui. Berdasarkan penelitian Elya et al (2012), disebutkan bahwa ekstrak etanol 80% daun *Antidesma bunius* ini mengandung senyawa golongan glikosida, tannin, saponin, sterol-terpen, dan antarquinon. Sedangkan, ekstrak etanol 80% korteks buni mengandung alkaloid, tannin, saponin, dan sterol-terpen. Dari penelitian tersebut, wuni dianggap memiliki potensi menghambat kerja enzim α -glukosidase dengan nilai IC_{50} 7,94 ppm.

Pada penelitian ini, ekstraksi senyawa fenolik dilakukan terhadap garau (*Antidesma montanum*) dan wuni (*Antidesma bunius*) Ekstrak yang diambil difokuskan pada ekstrak fenolik yang telah didapatkan dan diekstraksi bertingkat dengan pelarut yang meningkat kepolarannya (n-heksena, etil asetat, dan metanol). Pengujian secara *in vitro* dilakukan dengan membandingkan potensi dari semua ekstrak sebagai antioksidan, antidiabetes, dan kinetika penghambatan enzim. Potensi antioksidan dapat dilihat dari kemampuan ekstrak dalam meredam beberapa radikal bebas, sedangkan potensi antidiabetes dilihat dari kemampuan ekstrak dalam menghambat enzim yang terlibat dalam hidrolisis karbohidrat menjadi glukosa. Analisis kedua potensi pada ekstrak dilakukan secara spektrofotometri.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, adapun yang menjadi rumusan masalah adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana potensi antioksidan dari ekstrak fenolik daun garu dan wuni?
2. Bagaimana potensi antidiabetik dari ekstrak fenolik daun garu dan wuni
3. Bagaimana kinetika penghambatan α -amilase dan α -glukosidase dari ekstrak yang paling berpotensi sebagai antidiabetik?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sampel yang digunakan adalah bagian daun dari wuni (*Antidesma bunius*) dan garu (*Antidesma montanum*).
2. Analisis kinetika penghambatan enzim hanya dilakukan pada ekstrak fenolik yang paling berpotensi sebagai antidiabetik.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui potensi antioksidan dari ekstrak fenolik daun garu dan wuni
2. Mengetahui potensi antidiabetik dari ekstrak fenolik daun garu dan wuni
3. Mengetahui mekanisme penghambatan α -amilase dan α -glukosidase dari ekstrak yang paling berpotensi sebagai antidiabetik.

1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi yang bermanfaat bagi masyarakat dan peneliti terhadap potensi ekstrak daun garu dan wuni sebagai antioksidan dan antidiabetik.
2. Memberikan informasi perbandingan potensi dari daun garu dan wuni sebagai antioksidan dan antidiabetik.

3. Memberikan informasi kinetika dan mekanisme penghambatan α -amilase dan α -glukosidase oleh ekstrak yang paling berpotensi sebagai antidiabetik.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Taman Nasional Meru Betiri

Taman Nasional Meru Betiri merupakan salah satu Taman Nasional di Indonesia yang berupa kawasan pelestarian alam yang dikelola dengan sistem zonasi. Luas keseluruhan TNMB adalah 58.000 ha, yang terdiri atas daratan seluas 57.155 ha dan lautan seluas 845 ha. Secara administratif, seluas 36.700 ha termasuk Kabupaten Jember dan 21.300 ha termasuk Kabupaten Banyuwangi (Indonesia Travel, 2014).

Kawasan Taman Nasional Meru Betiri (TNMB) terletak pada 113058'38"-113058'30" BT dan 8020'48"-8033'48" LS dan secara administratif terletak diantara dua kabupaten, yaitu Jember dan Banyuwangi. Kawasan TNMB dikenal sebagai hutan tropis yang memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi. Total luas wilayah TNMB adalah 58.000 Ha dengan rincian 845 Ha adalah perairan 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 (Balai Taman Nasional Meru Betiri, 2014).

Jumlah flora yang teridentifikasi pada kawasan Taman Nasional Meru Betiri hingga saat ini sebanyak 518 jenis dan 15 jenis diantaranya dilindungi. Taman nasional ini merupakan habitat tumbuhan langka yaitu bunga raflesia (*Rafflesia zollingeriana*) yang merupakan tanaman endemik TNMB. Namun, beberapa jenis tumbuhan lainnya juga terdapat dalam kawasan TNMB seperti bakau (*Rhizophora* sp.), api-api (*Avicennia* sp.), waru (*Hibiscus tiliaceus*), nyamplung (*Calophyllum inophyllum*), rengas (*Gluta rengas*), bungur (*Lagerstroemia speciosa*), pulai (*Alstonia scholaris*), bendo (*Artocarpus elasticus*), dan beberapa jenis tumbuhan obat-obatan yang teridentifikasi sebanyak 239 jenis termasuk maja (*Aegle marmelos*) dan wuni (*Antidesma bunius*).

2.2 Garu (*Antidesma montanum*)

Tanaman garu berbentuk semak, memiliki daun tunggal, tata daun berseling setangkup, bentuk oblong sampai lanceolate, pangkal daun berbentuk acute sampai cuneate, pertulangan daun sekunder dan tertier jelas terlihat agak tenggelam membentuk jala, ukuran 3-5 cm x 10-15 cm. Buah dalam tandan berwarna putih jika masih muda dan berubah menjadi merah hitam jika telah masak. Tanaman ini termasuk liar dan belum dibudidayakan. Memiliki panjang hingga 20 meter (Zuhud *et al.*, 2013).

Berikut klasifikasi dari tanaman garu (*Antidesma montanum*) :

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Super Divisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Sub Kelas : Rosidae
Ordo : Euphorbiales
Famili : Euphorbiaceae
Genus : *Antidesma*
Spesies : *Antidesma montanum*

(Zuhud *et al.*, 2013).

Pemanfaatan tanaman garu ini tidak banyak diketahui oleh masyarakat. Sementara ini garu hanya digunakan untuk perawatan wanita nifas (setelah melahirkan). Menurut Xi-Long Zheng *et al.* (2013), daun dari garu (*Antidesma montanum*) dapat digunakan untuk pengobatan sakit kepala. Selain itu, daun garu juga dapat digunakan sebagai obat untuk sakit mata, anti cacar air dan malaria.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Elya *et al.* (2012), ekstrak etanol 80% daun *Antidesma montanum* mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, terpen, tanin, glikosida, dan saponin. Pada penelitian tersebut juga disebutkan bahwa pengujian IC₅₀ dari *Antidesma montanum* mencapai 2,83 µg/mL.

Antidesma montanum merupakan suatu jenis tanaman satu family dengan *Antidesma bunius* yang merupakan anggota family Euphorbiaceae yang tersebar mulai dari China, Vietnam, Thailand utara, India, dan Indonesia. Di Indonesia tanaman garu banyak ditemukan di pulau Kalimantan, Nusa Tenggara dan Jawa (Grace *et al.*, 2013).

2.3 Wuni (*Antidesma bunius*)

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

Berikut klasifikasi dari tanaman wuni (*Antidesma bunius*)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta (Angiospermae)
Kelas	: Magnoliopsida (Dicotyledonea)
Bangsa	: Euphorbiales
Suku	: Euphorbiaceae
Marga	: <i>Antidesma</i>
Jenis	: <i>Antidesma bunius</i>
Nama umum	: Wuni, Buni, Huni

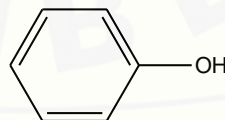
Menurut (Elya *et al.*, 2012), ekstrak etanol daun antidesma bunius mengandung senyawa golongan glikosida, tanin, saponin, sterol-terpen, dan antrakuinon. Sedangkan, ekstrak etanol 80% korteks antidesma bunius mengandung alkaloid, tanin, dan sterol terpen.

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

Antidesma bunius merupakan suatu jenis tanaman dari famili Euphorbiaceae yang tersebar luas mulai dari Sri Lanka, India Selatan, Himalaya Timur, Myanmar, Indo Cina, Cina Selatan, Thailand, Malaysia (Pulau Banggi), dan Australia (Quennsland). Dibudidayakan secara luas di Indonesia (terutama di Jawa), Malaysia dan Filipina (Sosef *et al.*, 1998).

2.4 Senyawa Metabolit Sekunder: Fenolik

Fenolik merupakan salah satu kelompok besar senyawa metabolit sekunder yang umumnya dijumpai pada tanaman tingkat tinggi. Menurut Vermerris dan Nicholson (2006), senyawa fenolik adalah senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatik. Dengan kata lain, senyawa fenolik adalah senyawa yang sekurang-kurangnya memiliki satu gugus fenol.



Gambar 2.1. 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. Anggota senyawa fenolik mulai dari yang paling sederhana dengan berat molekul kecil hingga senyawa yang kompleks dengan berat molekul lebih dari 30.000 Da.

Hampir semua senyawa fenolik yang telah teridentifikasi memiliki aktivitas antioksidan atau sifat penangkap radikal bebas. Senyawa kimia yang tergolong sebagai senyawa fenolik sangat banyak macamnya, oleh karena itu berbagai cara klasifikasi dilakukan oleh banyak ilmuwan. Salah satu metode klasifikasi adalah berdasarkan jumlah karbon pada molekul yang dilakukan oleh Harbone dan Simmonds (1964). Rincian klasifikasi tersebut disajikan pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Klasifikasi senyawa fenolik berdasarkan jumlah atom karbon

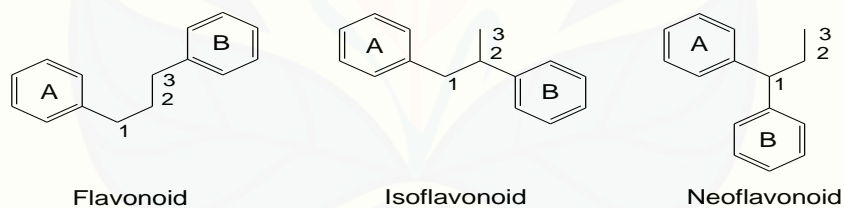
Struktur	Kelas
C_6	Fenolik sederhana
C_6-C_1	Asam fenolat dan senyawa yang berhubungan lainnya
C_6-C_2	Asetofenon dan asam fenilasetat
C_6-C_3	Fenilpropanoid dan Koumarin
$C_6-C_1-C_6$; $C_6-C_2-C_6$	Benzofenon, xanton, stilbenoid
C_{10} , C_{14}	Kuinon
C_{15} , C_{30}	Golongan flavonoid
C_{18}	Betasianin
Dimer, Oligomer, Polimer	Lignan, neolignan, lignin, tanin, <i>phlobaphene</i>

2.4.1 Flavonoid

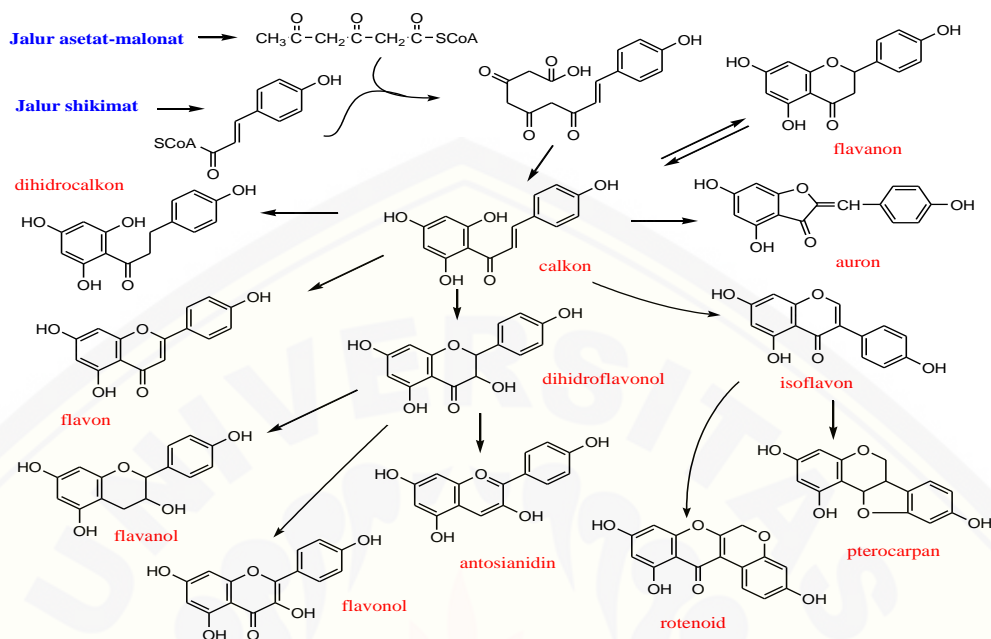
Flavonoid merupakan turunan dari 1,3-difenilpropana dengan kerangka dasarnya $C_6-C_3-C_6$ berupa dua cincin aromatik yang dihubungkan dengan tiga karbon. Flavonoid tersebar luas di tanaman tingkat tinggi dan bahkan di tanaman tingkat rendah seperti alga. Menurut Dewick (2002), flavonoid berkontribusi dalam menentukan warna pada tanaman. Warna kuning pada tanaman disebabkan oleh *chalcones* dan *flavonols*, sedangkan warna merah, biru, dan ungu dari

anthocyanidins. Menurut Sarker dan Nahar (2007), hampir semua flavonoid umumnya berbentuk glikosida, sehingga dikenal istilah monoglikosidat, diglikosidat dan seterusnya bergantung pada jumlah gula yang diikat. Disamping itu hampir semua senyawa flavonoid berpotensi sebagai antioksidan.

Biosintesis flavonoid bersal dari turunan 1,3-difenilpropana seperti kaemferol. Flavonoid terdiri dari dua cincin yang disebut cincin A dan B. Cincin B adalah gugus sinamoil yang berasal dari jalur asam shikimat sedangkan cincin A, gugus benzoil dari jalur asetat-malonat. Satu gugus hidroksil cincin A selalu posisinya *orto* terhadap rantai sampingnya. Flavonoid memiliki dua kelas lagi, yaitu isoflavonoid dan neoflavonoid berdasarkan perbedaan posisi ikatan substituent fenil cincin B. Isoflavonoid merupakan kelas dari flavonoid dimana cincin B mengikat rantai samping cincin A pada posisi 2, sedangkan neoflavonoid pada posisi 1 (gambar 2.15). Jalur lengkap biosinsesis flavonoid dan hubungan antar senyawa flavonoid ditunjukkan oleh gambar 2.16.



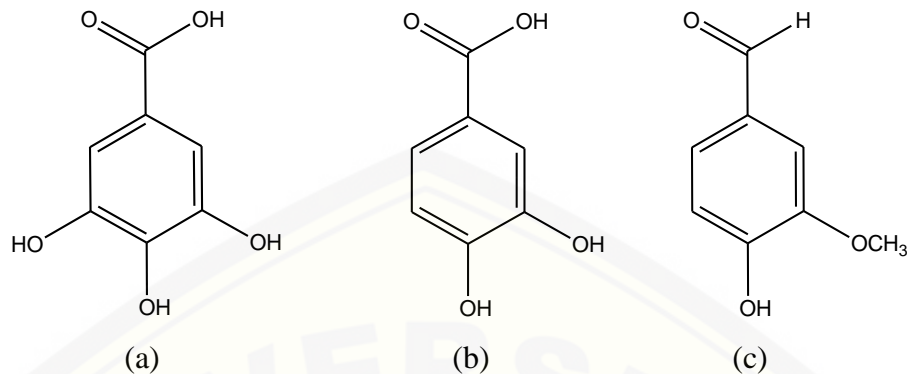
Gambar 2.2 Struktur kimia flavonoid, isoflavonoid dan neoflafonoid



Gambar 2.3 Jalur biosintesis flavonoid dan hubungan antar senyawanya

2.4.2 Asam Fenolat dan Senyawa yang Berhubungan Lainnya (Aldehid)

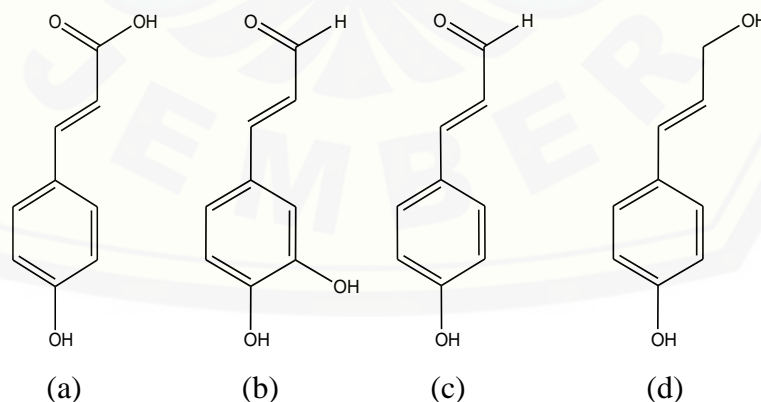
Senyawa fenolik dari golongan asam fenolat adalah fenol yang tersubstitusi oleh gugus karboksil, contohnya *gallic acid* dan *protocatechuic acid*. Asam galat merupakan trifenol yang biasa terdapat di daun teh dalam bentuk teresterifikasi bersama dengan katekin. Selain gugus karboksil, gugus lainnya seperti aldehid juga dapat tersubstitusi di gugus fenol, contohnya senyawa vanilin. Senyawa vanilin berasal dari kacang vanila dan merupakan flavor paling terkenal di dunia (Vermerris dan Nicholson, 2006).



Gambar 2.4. (a) Gallic Acid; (b) protocatechuic acid; (c) Vanilin

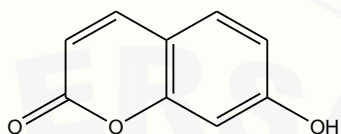
2.4.3 Fenilpropanoid dan Coumarins

Keberadaan senyawa fenolik dengan struktur C₆-C₃ berlimpah di tanaman dalam bentuk bebas atau sebagai polimer di dinding sel. Fenilpropanoid adalah senyawa aromatik dengan rantai samping propil yang terikat ke cincin benzena yang diturunkan secara langsung dari fenilalanin. Fenilalanin secara alami mengandung substituen oksigen seperti -OH, -OMe, dan metilenadioksi pada cincin benzena. Fenilpropanoid yang memiliki substituen hidroksil pada cincin benzenanya merupakan kelompok fenolik (Sarker dan Nahar, 2007). Selain itu ada pula senyawa fenolik lain yang memiliki kerangka mirip dengan fenilpropanoid namun dengan gugus karboksil yang diganti dengan gugus aldehid dan hidroksil, contohnya senyawa p-koumaril aldehid dan p-koumaril alkohol (Vermerris dan Nicholson, 2006).



Gambar 2.5. (a) asam p-koumarat; (b) asam kafeat; (c) p-koumaril aldehid; (d) p-koumaril alkohol

Senyawa fenolik lain dengan struktur C₆-C₃ adalah kumarin. Kumin memiliki kerangka yang mirip dengan fenilpropanoid. Perbedaan antara kumin dan fenilpropanoid adalah atom oksigen pada gugus karboksil kumin mengalami siklisasi. Contoh senyawa kumin sederhana adalah umbeliferon (Vermerris dan Nicholson, 2006).

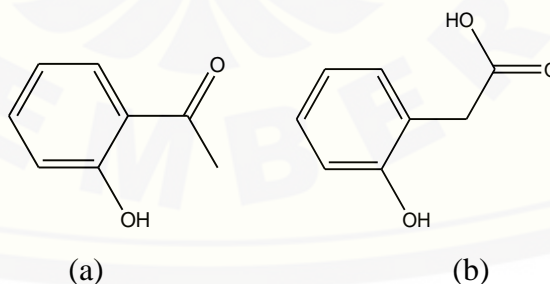


Gambar 2.6 Umbeliferon

Senyawa kumin banyak terkandung di tanaman Rubiaceae — *Asperula*; Poaceae — *Avena*; Fabaceae — *Medicago*, *Melilotus*; Rutaceae — *Ruta*, *Citrus sp.*, *Murraya*; Apiaceae — *Angelica*, *Ammi* (Pengelly, 2004).

2.4.4 Asetofenon dan Asam Fenilasetat

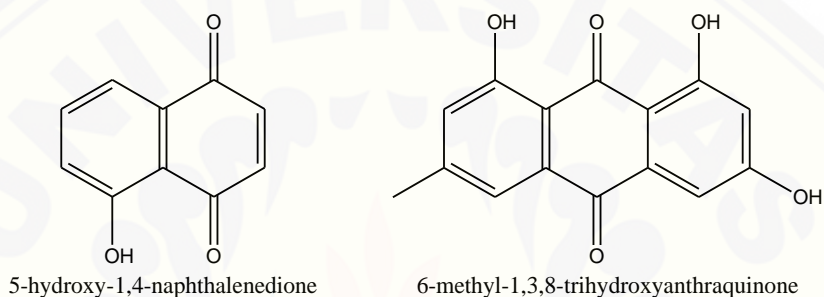
Asetofenon dan asam fenilasetat adalah golongan senyawa fenolik yang jarang ditemukan di alam. Asetofenon dikenali dengan adanya gugus aseton yang tersubstitusi di fenol, contohnya 2-hidroksiasetofenon. Asam fenilasetat juga memiliki gugus karboksil, namun berbeda dengan asam fenolat, gugus karboksil pada asam fenilasetat tidak berikatan langsung dengan cincin benzene, contohnya 2-hidroksifenilasetat (Vermerris dan Nicholson, 2006).



Gambar 2.7. (a) 2-hidroksiasetofenon; (b) asam 2-hidroksifenilasetat

2.4.5 Kuinon

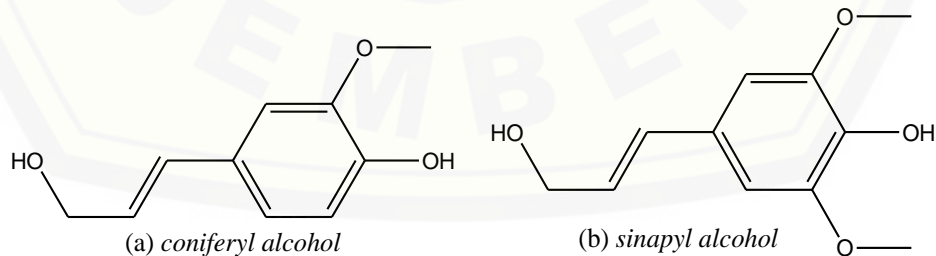
Jenis senyawa kuinon yang termasuk dalam kelompok senyawa fenolik adalah naftakuinon (C_{10}) dan antrakuinon (C_{14}). Naftakuinon merupakan senyawa fenolik yang jarang dijumpai. Juglon adalah salah satu contoh senyawa naftakuinon yang cukup dikenal. Antrakuinon merupakan kuinon yang paling banyak ditemukan pada tanaman tingkat tinggi maupun jamur. Salah satu contoh antrakuinon adalah emodin (Vermerris dan Nicholson, 2006).



Gambar 2.8. Contoh Senyawa Kuinon (a) Juglon; (b) Emodin

2.4.6 Lignan, Neolignan, dan Lignin

Lignan merupakan kelompok besar senyawa fenolik tanaman yang biosintesisnya melalui penggabungan dua molekul fenilpropana. Senyawa fenilpropana yang dimaksud antara lain p-koumaril alkohol (gambar 2.13d), koniferil alkohol (gambar 2.20a), dan sinapil alkohol (gambar 2.20b). Koniferil alkohol merupakan senyawa fenilpropana yang paling sering digunakan dalam biosintesis lignan contohnya *podophyllotoxin* (gambar 2.21).

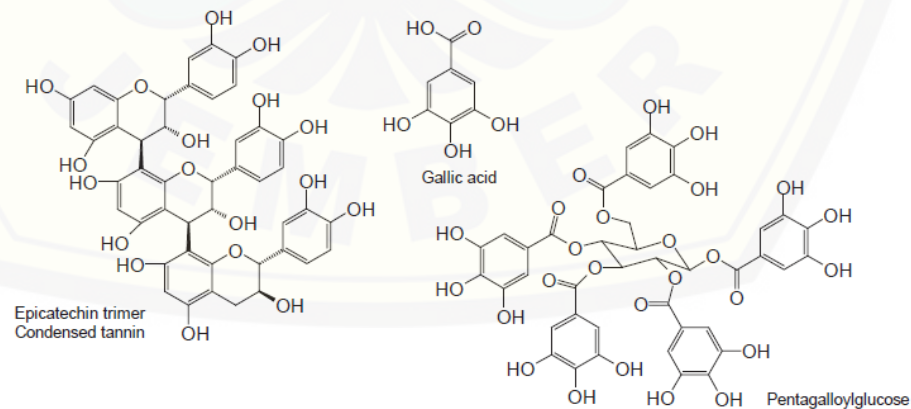


Gambar 2.9 kelompok senyawa fenilpropana penyusun lignin

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. Neolignan juga merupakan dimer fenilpropana tetapi strukturnya didapat dengan menggabungkan dua radikal mesomerik dengan tipe ikatan selain C_{β} - $C_{\beta'}$ atau C_8 - C_8' , sedangkan Lignin adalah polimer dari lignan atau neolignan (Sarker dan Nahar, 2007).

2.4.7 Tanin

Minyak tanin merupakan polifenol pada tanaman. Tanin juga dianggap sebagai perlindungan tanaman terhadap serangan mikroba. Tanin membentuk warna biru gelap atau kehijau-hijauan dalam air ketika bereaksi dengan garam besi ($FeCl_3$). 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. *Gallotannins* merupakan contoh tanin terhidrolisis yang menghasilkan gula dan asam galat ketika dihidrolisis. *Pentagalloylglucose* merupakan salah satu jenis *gallotannins* yang digunakan dalam industri sedangkan *Epicatechin trimer* merupakan contoh tanin terkondensasi (gambar 2.17) (Sarker dan Nahar, 2007).



Gambar 2.10 Struktur kimia tanin terkondensasi dan terhidrolisis

2.5 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam. Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah proses oksidasi lipid. Dalam arti khusus, antioksidan adalah zat yang dapat menunda atau mencegah terbentuknya reaksi radikal bebas (peroksida) dalam oksidasi lipid (Dalimartha dan Soedibyo, 1999).

Antioksidan dalam pengertian kimia, merupakan senyawa pemberi elektron. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa terhambat. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas (Winarsi, 2007).

Antioksidan adalah senyawa yang melindungi sel dari kerusakan yang disebabkan ketidakstabilan molekul yang diketahui sebagai radikal bebas. Antioksidan berinteraksi dan menstabilkan radikal bebas dan memungkinkan mencegah kerusakan radikal bebas yang disebabkan olehnya. Kerusakan radikal bebas juga dapat menyebabkan kanker. Contohnya dari antioksidan seperti beta-karoten, likopen, vitamin C,E,A dan senyawa yang lain (Sies, 1997).

Antioksidan adalah molekul yang mampu memperlambat atau mencegah oksidasi molekul lain. Oksidasi adalah reaksi kimia yang mentransfer elektron dari substansi ke gugus oksidasi. Reaksi oksidasi dapat menghasilkan radikal bebas, yang memulai reaksi berantai yang merusak sel. Antioksidan menghentikan rantai reaksi dengan menghapus intermediet radikal bebas dan menghambat reaksi oksidasi lainnya dengan menjadi teroksidasi sendiri. Akibatnya, antioksidan sering mengurangi gugus seperti tiol, asam askorbat atau polifenol (Sies, 1997).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat spesies oksigen reaktif, spesies nitrogen reaktif dan radikal bebas lainnya sehingga mampu mencegah kerusakan pada sel normal, protein, dan lemak yang akhirnya mencegah penyakit-

penyakit degeneratif. Radikal bebas adalah molekul yang kehilangan satu elektron sehingga molekul tersebut menjadi tidak stabil. Antioksidan memiliki struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya (Halliwell dan Gutteridge, 2000).

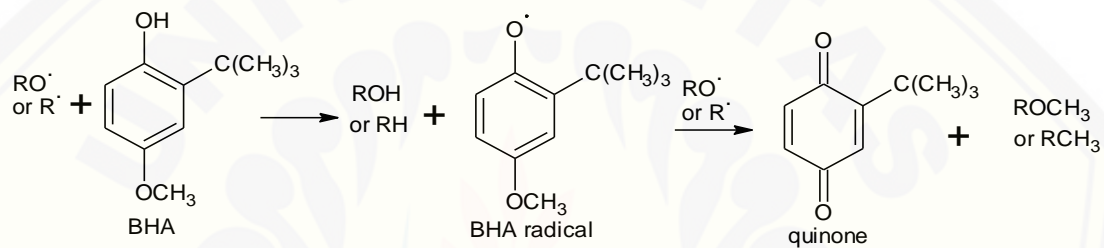
Sel memiliki antioksidan alami seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, reduktase, glutathion peroksidase dan antioksidan yang bisa mempertahankan dan perlindungan dari pengaruh radikal bebas. Namun, ketika radikal bebas lebih banyak daripada kemampuan pertahanan antioksidan alami tersebut bisa mengalami gangguan sehingga memutuskan rantai reduksi oksidasi normal dan mengakibatkan kerusakan oksidatif jaringan yang sering dikenal dengan stress oksidatif (Wuryastuti, 2000).

Antioksidan alami pada tumbuhan umumnya berupa senyawa fenolik atau polifenol yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam-asam organik polifungsional. Senyawa antioksidan alami polifenolik ini adalah multifungsional dan dapat beraksi sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkelat logam, dan peredam terbentuknya singlet oksigen (Sulistiyani *et al.*, 2011). Berdasarkan hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan, diyakini bahwa flavonoid sebagai salah satu kelompok senyawa fenolik yang memiliki sifat antioksidatif serta berperan dalam mencegah kerusakan sel dan komponen selularnya oleh radikal bebas reaktif (Redha, 2010).

Pada umumnya senyawa antioksidan alami dapat diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut tertentu. Perbedaan posisi gugus fungsi suatu senyawa dapat mempengaruhi kepolaran suatu senyawa, sehingga ekstraksi menggunakan pelarut dengan kepolaran yang berbeda lebih efektif untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder dengan kepolaran yang berbeda (Pambayun *et al.*, 2007).

Secara umum antioksidan dapat dikelompokkan berdasarkan sumber dan mekanisme reaksinya. Antioksidan berdasarkan sumbernya yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia). Beberapa dari antioksidan sintetik yang telah banyak digunakan adalah antioksidan dari golongan

fenol seperti BHA (*butylated hydroxyanisol*), BHT (*butylated hydroxytoluena*), TBHQ (*tersier butylhidroquinone*) dan ester asam galat seperti PG (*propil galat*) (Gordon, 1990). Antioksidan sintetik telah sepenuhnya diuji reaksi toksisitasnya tetapi beberapa diantaranya menjadi toksik setelah penggunaan dalam waktu lama (Takashi dan Takayuni, 1997). Antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alam) ditemukan pada sebagian besar tanaman mikroorganisme, jamur dan jaringan pada binatang (Gordon, 1990). Antioksidan alami dari golongan fenol dan turunannya misalnya flavonoid, tokoferol, lignin dan asam fenolat.



Gambar 2.11 Reaksi BHA dan radikal bebas (Wade, 2006)

Antioksidan berdasarkan mekanisme reaksi yaitu antioksidan primer dimana antioksidan dapat memberikan atom hidrogen kepada senyawa radikal yang terbentuk dan diubah menjadi senyawa yang tidak reaktif atau stabil. Antioksidan sekunder merupakan senyawa yang berfungsi menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar. Sedangkan antioksidan tersier merupakan senyawa yang memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak karena serangan radikal bebas (Winarsi, 2007).

2.6 Simplisia, Ekstrak, dan Ekstraksi

2.6.1 Simplisia

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

nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan, atau eksudat tumbuhan (DepKes RI, 1979).

2.6.2 Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dari simplisia nabati atau simplisia hewani dengan cara ekstraksi senyawa aktif menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (DepKes RI, 1995). Ekstrak cair adalah sediaan simplisia nabati yang mengandung etanol sebagai pelarut atau sebagai pengawet (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

Ekstrak yang diperoleh berdasarkan sifatnya dapat dibagi menjadi :

- Ekstrak encer (*Extractum tenue*), sediaan ini masih dapat dituang.
- Ekstrak kental (*Extractum spissum*), sediaan ini tidak dapat dituang dan memiliki kadar air sampai 30%.
- Ekstrak kering (*Ekstractum siccum*), sediaan ini berbentuk serbuk, dibuat dari ekstrak tumbuhan yang diperoleh dari penguapan bahan pelarut.
- Ekstrak cair (*Ekstractum fluidum*), mengandung simplisia nabati yang mengandung etanol sebagai bahan pengawet (Voight, 1995).

2.6.3 Ekstraksi

Ekstraksi sebagai istilah yang digunakan secara farmasi, melibatkan pemisahan bagian aktif sebagai obat dari jaringan tanaman atau hewan dari komponen aktif atau lembam dengan pelarut selektif dalam standar prosedur ekstraksi. Produk yang dihasilkan dari tanaman relatif merupakan cairan murni, semipadat, atau serbuk yang ditunjukkan hanya untuk penggunaan oral atau eksternal (United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008).

Ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut dari suatu serbuk simplisia, sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut (Parameter, 2000). Berikut metode umum dari ekstraksi pada tanaman obat:

a) Maserasi

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (suhu kamar) (Parameter, 2000). Pada proses ini seluruh bubuk kasar obat mentah ditempatkan pada wadah tertutup dengan pelarut tertentu dan didiamkan pada suhu kamar untuk jangka waktu minimal 3 hari dengan cara agitasi sampai larut. Setelah didiamkan, maka campuran kemudian disaring, campuran bahan yang padat basah (marc) ditekan, dan campuran larutan difiltrasi atau didekantasi (United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008).

b) Infus

Infus segar disiapkan dengan cara maserasi obat mentah dalam waktu yang singkat dengan menggunakan air dingin atau panas (United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008).

c) Digesti

Ini adalah bentuk maserasi yang sangat panas selama proses ekstraksi. Hal ini digunakan ketika suhu sedang. Efisiensi pelarut dari menstrum demikian meningkat (United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008).

d) Dekoksi

Pada proses ini, obat mentah dididihkan pada air dengan volume spesifik selama waktu yang ditentukan, kemudian didinginkan dan disaring (United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008).

e) Perlokasi

Ini adalah prosedur yang paling sering digunakan untuk mengekstrak bahan aktif dalam penyusunan tinctures (larutan obat dalam alkohol) dan ekstrak fluida (United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008).

f) Soxhlet

Metode ekstraksi untuk bahan yang tahan pemanasan dengan cara meletakkan bahan yang akan diekstraksi dalam sebuah kantung ekstraksi (kertas saring) di dalam sebuah alat ekstraksi (kertas saring) di dalam sebuah alat ekstraksi dari gelas yang bekerja kontinyu (Voight, 1955).

2.7 Diabetes melitus

Diabetes berasal dari bahasa Yunani yang berarti “mengalirkan atau mengalihkan”. Sedangkan melitus berasal dari bahasa latin yang bermakna manis atau madu. Penyakit diabetes melitus dapat diartikan individu yang mengalirkan volume urin yang banyak dengan kadar glukosa tinggi. Diabetes melitus adalah penyakit hiperglikemia yang ditandai dengan kekurangan hormon insulin baik absolut maupun relatif. Hasil pemeriksaan kadar glukosa darah sewaktu $>200\text{mg/dl}$ dan kadar glukosa darah puasa $>126\text{mg/dl}$ dapat digunakan sebagai patokan diagnosis diabetes melitus (Dirjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2005). Beberapa gejala diabetes antara lain :

- Poliuria (peningkatan pengeluaran urin) karena air mengikuti glukosa yang keluar melalui urin.
- Polidipsia (peningkatan rasa haus) akibat volume urin yang sangat besar dan keluarnya air yang menyebabkan dehidrasi ekstra sel. Dehidrasi intrasel mengikuti dehidrasi ekstrasel karena air intrasel akan berdifusi keluar sel mengikuti penurunan gradient konsentrasi ke plasma yang hipertonik (konsentrasi tinggi).

- Rasa lelah dan kelemahan otot akibat katabolisme protein di otot dan ketidakmampuan sebagian besar sel untuk menggunakan glukosa sebagai energi.
- Polifagia (peningkatan rasa lapar) akibat katabolisme protein dan lemak, dan kelaparan relatif sel (Corwin, 2008).

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit metabolik kronis yang ditandai dengan kandungan gula darah di atas normal. DM secara klasik dikelompokkan ke dalam dua tipe, yaitu DM tipe I dan tipe II berdasarkan sebab timbulnya penyakit. Namun menurut Poretsky (2009), terdapat dua pengelompokan DM lain di samping tipe I dan II. DM tipe I bergantung terhadap hormon insulin. Sedangkan, DM tipe II tidak bergantung terhadap insulin. DM tipe II disebabkan oleh abnormal atau rusaknya permukaan sel yang berfungsi sebagai reseptor dan kerusakan di bagian dalam sel, atau kombinasi keduanya. Sedangkan berdasarkan dokumen konsensus tahun 1997 oleh *American Diabetes Association's Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes melitus* menjabarkan empat kategori utama diabetes, seperti berikut:

a. Diabetes melitus tipe 1

DM tipe 1 atau biasa disebut diabetes melitus dependen insulin (DM1) adalah penyakit hiperglikemia akibat ketiadaan absolut insulin. DM tipe 1 diperkirakan timbul akibat destruksi otoimun sel-sel beta pulau Langerhans. Serangan optimum dapat timbul setelah infeksi virus, misalnya gondongan, rubella, sitomegalovirus kronik, atau setelah pajanan obat atau toksin. Pengidap penyakit ini harus mendapat insulin pengganti (Corwin, 2008).

b. Diabetes melitus tipe 2

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

Diabetes melitus tipe 2 berkaitan dengan kegemukan. Selain itu, pengaruh genetik, yang menentukan kemungkinan seorang mengidap penyakit ini, cukup kuat. Diperkirakan bahwa terdapat suatu sifat yang belum teridentifikasi yang menyebabkan pankreas mengeluarkan insulin yang berbeda, atau menyebabkan reseptor insulin tidak dapat berespon secara kuat terhadap insulin. Mungkin juga terdapat kaitan genetik antara kegemukan dan rangsangan berkepanjangan reseptor-reseptor insulin yang mengakibatkan penurunan jumlah reseptor insulin yang terdapat di sel-sel (Corwin, 2008).

c. Diabetes melitus tipe 3

Pada diabetes tipe ini, hiperglikemia berkaitan dengan penyakit-penyakit lain. Penyakit tersebut meliputi pankreatektomi atau penyakit pancreas, kelainan genetic pada kerja insulin, penyakit endokrin seperti sindrom *cushing*, akromegali atau penyakit endokrin lain (Ganong, 1996).

d. Diabetes melitus tipe 4

Diabetes melitus tipe 4 atau diabetes gestational, adalah diabetes yang terjadi pada wanita hamil yang sebelumnya tidak mengidap diabetes (Corwin, 2008). Diabetes melitus dapat diobati melalui mekanisme kerja obat hipoglikemik oral melalui perangsangan insulin, sensitizer insulin dan penghambatan aktivitas α -glukosidase (Hongxiang *et al.*, 2009). Namun, selain itu juga dapat dilakukan terapi penyembuhan non farmakologi diabetes melitus melalui diet dan olahraga.

Berbagai komplikasi dapat diakibatkan oleh rendahnya kontrol diabetes. Komplikasi tersebut antara lain berupa penyakit vaskular sistemik (percepatan aterosklerosis), penyakit jantung, penyakit mikrovaskular pada mata, kerusakan ginjal serta kerusakan saraf tepi (neuropati diabetik) (Halliwell, 1999). Ketika diabetes terdeteksi, sindrom ini sudah berkembang dan telah terdapat satu atau dua komplikasi.

Luasnya komplikasi pada diabetes tampaknya berkorelasi dengan konsentrasi glukosa darah sehingga glukosa berlebih diduga menjadi penyebab utama kerusakan jaringan (Rahbani *et al.*, 1999). Fenomena ini dapat disebabkan oleh

kemampuan hiperglikemia secara *in vivo* dalam modifikasi oksidatif berbagai substrat. Selain itu, hiperglikemia juga terlibat dalam proses pembentukan radikal bebas (Droge, 2002). Hiperglikemia menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif (Ueno *et al.*, 2002). Pembentukan senyawa oksigen reaktif tersebut dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan. Modifikasi molekuler pada berbagai jaringan tersebut mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan peningkatan produksi radikal bebas. Hal itu merupakan awal kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stres oksidatif (Nuttal *et al.*, 1999). Untuk meredam kerusakan oksidatif tersebut diperlukan antioksidan. Peningkatan suplai antioksidan yang cukup akan membantu pencegahan komplikasi klinis diabetes melitus, meskipun data penelitian belum konsisten. Komplikasi diabetes melitus dapat digambarkan dalam gambar 2.1 berikut:

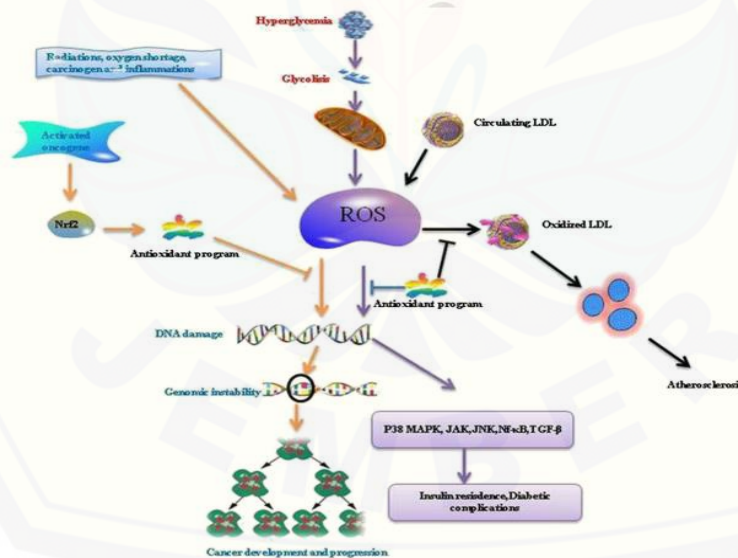


Fig. 1. Antioxidants/oxidative stress and health diseases.

Gambar 2.12. Komplikasi Diabetes

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. α -amilase dan α -glukosidase merupakan dua enzim utama yang menghidrolisis polisakarida menjadi glukosa.

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

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

α -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).

Enzyme code dari α -glukosidase yakni 3.2.1.20 dengan klasifikasi enzim 3 merupakan kelas hidrolase, 2 merupakan glikosilase, 1 merupakan enzim hidrolisis O- dan S-glikosil dan 20 merupakan alfa-glukosidase. Merupakan enzim yang bertanggung jawab terhadap konversi karbohidrat menjadi glukosa. Enzim ini

merupakan enzim utama untuk mencegah karbohidrat dan oligosakarida menjadi monosakarida dalam usus kecil (Lee *et al.*, 2007). Enzim ini mengkatalisis hidrolisis ikatan glikosidik α -1,4 karbohidrat sehingga melepaskan α -glukosa dan meningkatkan kadar gula darah setelah makan (Wu, 2011).

Karbohidrat akan dicerna oleh enzim di dalam mulut dan usus menjadi gula yang lebih sederhana yang kemudian akan diserap ke dalam tubuh dan meningkatkan kadar gula darah. Proses pencernaan karbohidrat tersebut menyebabkan pankreas melepaskan α -glukosidase ke dalam usus yang akan mencerna karbohidrat menjadi oligosakarida yang kemudian akan diubah lagi menjadi glukosa oleh α -glukosidase yang dikeluarkan oleh sel-sel usus halus yang kemudian akan diserap ke dalam tubuh. Dengan dihambatnya kerja α -glukosidase, kadar glukosa dalam darah dapat dikembalikan dalam batas normal (Bosenberg, 2008).

2.8 Mekanisme Penghambatan Aktivitas Enzim

Penghambatan enzim dapat digolongkan ke dalam dua sifat, yaitu penghambatan *irreversible* dan penghambatan *reversible*. Penghambatan *irreversible* terjadi bila suatu penghambat membentuk ikatan kovalen dengan enzim sehingga membentuk kompleks yang bersifat tetap dan tidak dilepaskan dengan cara pengenceran maupun dialisis. Penghambat *irreversible* disebut juga sebagai inaktifator enzim. Penghambatan *reversible* terjadi bila suatu penghambat membentuk ikatan nonkovalen dengan enzim sehingga dapat dilepaskan dari enzim dengan cara pengenceran, filtrasi gel, atau dialisis (Champe *et al.*, 2005). Penghambatan *reversible* memiliki 3 tipe kerja, yaitu penghambatan kompetitif, penghambatan nonkompetitif, dan penghambatan kompetitif campuran (Storey, 2004; Mc Pherson dan Pincus, 2007);

a. Penghambatan kompetitif

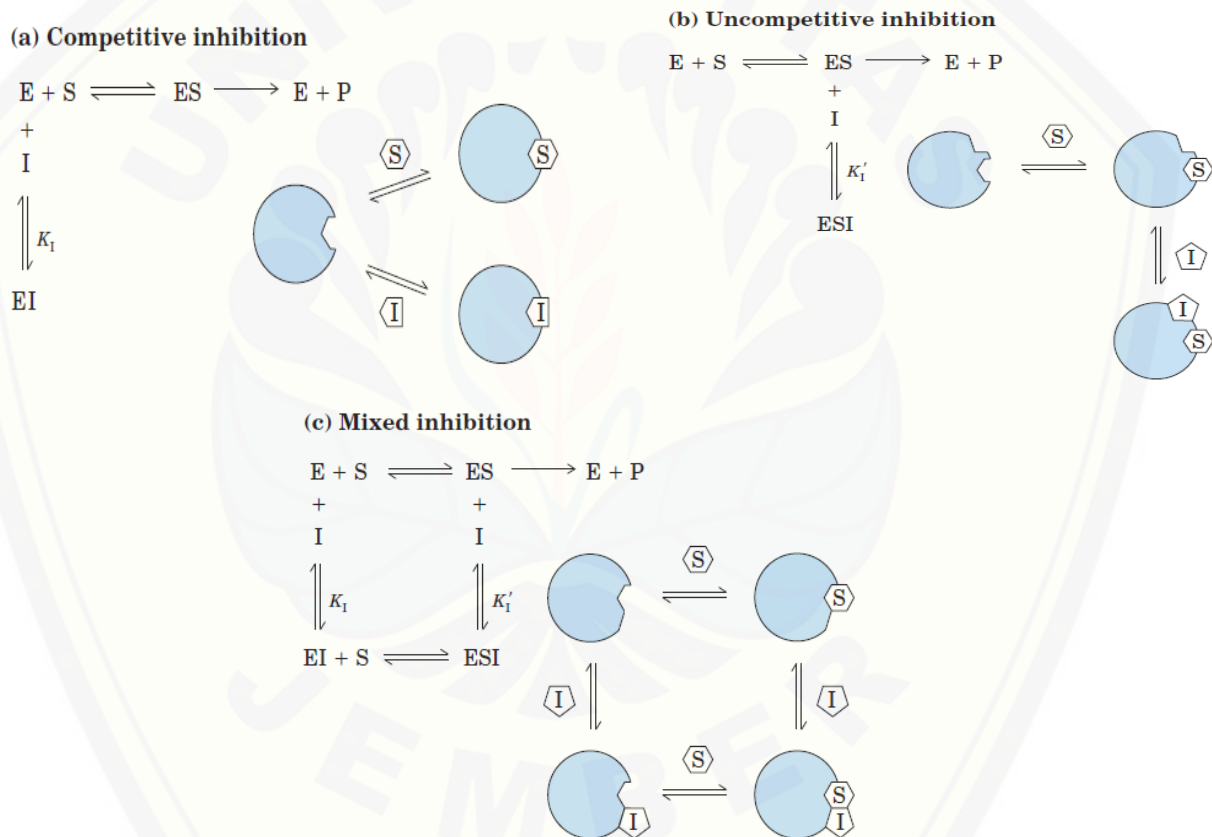
Penghambatan kompetitif terjadi bila suatu penghambat dengan struktur yang menyerupai substrat normal, berkompetisi dengan substrat normal untuk berikatan pada sisi aktif.

b. Penghambatan *unkompetitif*

Penghambatan nonkompetitif terjadi bila suatu penghambat berikatan dengan sisi yang berbeda dengan substrat normal pada enzim, sehingga substrat masih dapat berikatan dengan sisi aktif.

c. Penghambatan kompetitif campuran

Penghambatan kompetitif campuran terjadi bila suatu penghambat berikatan dengan sisi aktif yang berbeda dengan substrat normal pada enzim, sehingga substrat masih dapat berikatan dengan sisi aktif enzim.



Gambar 2.13 Tipe Inhibisi Enzim

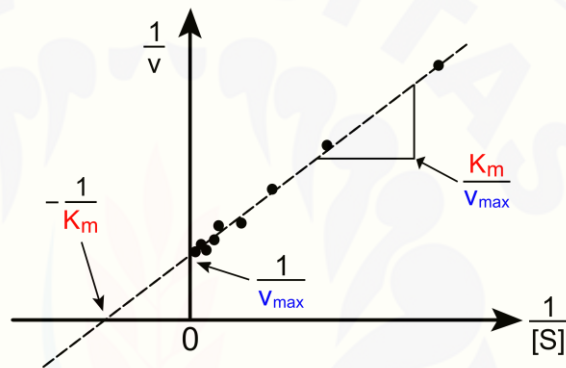
2.9 Kinetika Penghambatan Enzim

Jenis penghambatan ditentukan dengan analisis data menggunakan metode *Lineweaver-Burk* untuk memperoleh tetapan kinetika *Michaelis-Menten* (Dewi *et al.*,

2007). Persamaan *Michaelis-Menten* memperlihatkan secara matematis hubungan antara kecepatan reaksi yang bervariasi dengan variasi konsentrasi substrat.

Tetapan kinetika *Michaelis-Menten* dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = a + bx$ yang diperoleh melalui penurunan persamaan *Michaelis-Menten*, dimana x adalah $1/[S]$ dan y adalah $1/V_i$ (Murray *et al*, 2006). Berikut persamaan dari tetapan kinetika *Michaelis-Menten*:

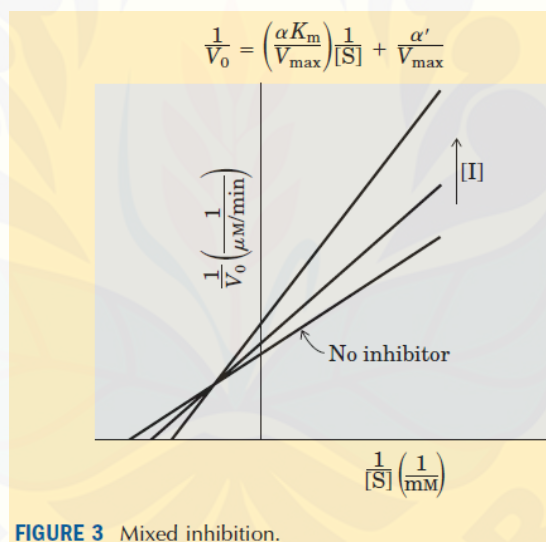
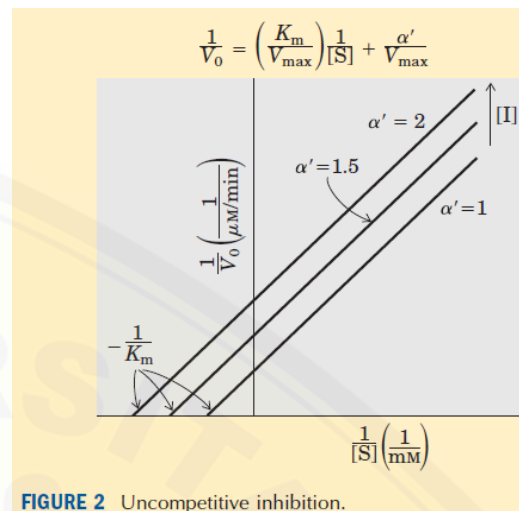
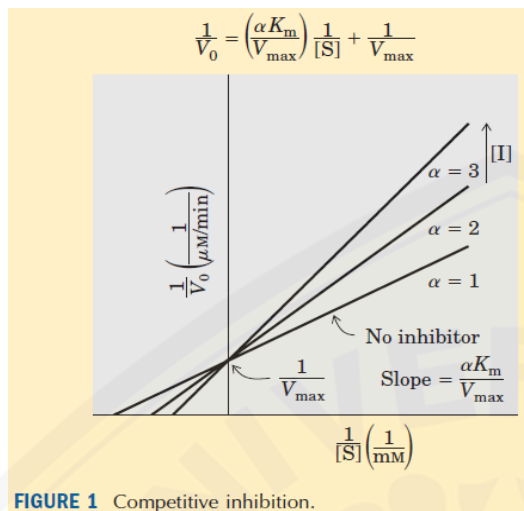
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$



Gambar 2.14 Persamaan dan Grafik persamaan *Lineweaver-Burk*

K_m adalah tetapan *Michaelis-Menten* yang mencerminkan afinitas enzim terhadap substrat. Nilai K_m yang kecil mencerminkan afinitas yang besar, sebab kecepatan reaksi maksimum dapat diraih pada konsentrasi substrat yang rendah, sedangkan nilai K_m yang besar mencerminkan afinitas yang kecil, sebab kecepatan reaksi maksimum hanya dapat diraih pada konsentrasi substrat yang tinggi. Nilai K_m secara numeric berbanding lurus dengan konsentrasi substrat (Champe *et al.*, 2005).

Untuk menentukan apakah suatu inhibisi termasuk tipe kompetitif, unkompetitif, atau campuran, maka digunakan persamaan *Lineweaver-Burk* karena masing-masing tipe inhibisi memiliki karakteristik plot yang berbeda. Gambar 2.19 menunjukkan karakteristik plot *Lineweaver-Burk* untuk masing-masing tipe inhibisi (Nelson dan Cox, 2008).



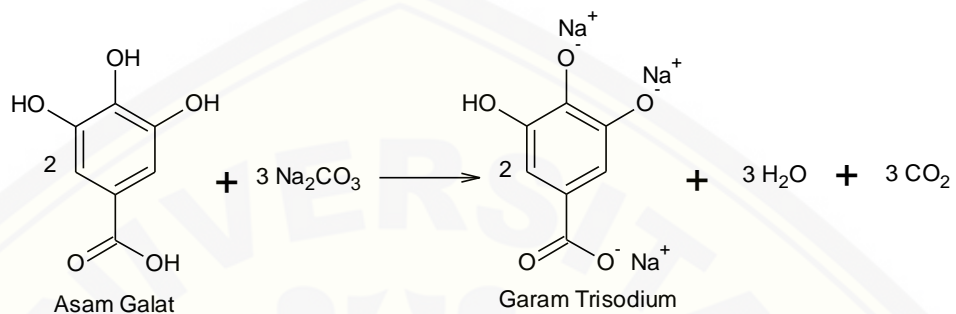
Gambar 2.15 Plot Lineweaver-Burk untuk tiga tipe inhibisi

2.10 Prinsip Analisis Antioksidan dan Antidiabetik

2.10.1 Analisis Total Fenolik

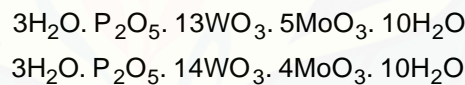
Satuan dasar yang digunakan dalam analisis potensi senyawa fenolik sebagai antioksidan dan antidiabetik adalah total fenoliknya. Asam galat yang digunakan sebagai standar senyawa fenolik akan bereaksi dengan natrium karbonat

menghasilkan ion fenolat. Menurut Rayner & Raynel (2011), ion fenolat dari asam galat adalah garam *trisodium*. Persamaan reaksi kimia yang mungkin terjadi ditampilkan oleh Gambar 2.16.



Gambar 2.16 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:

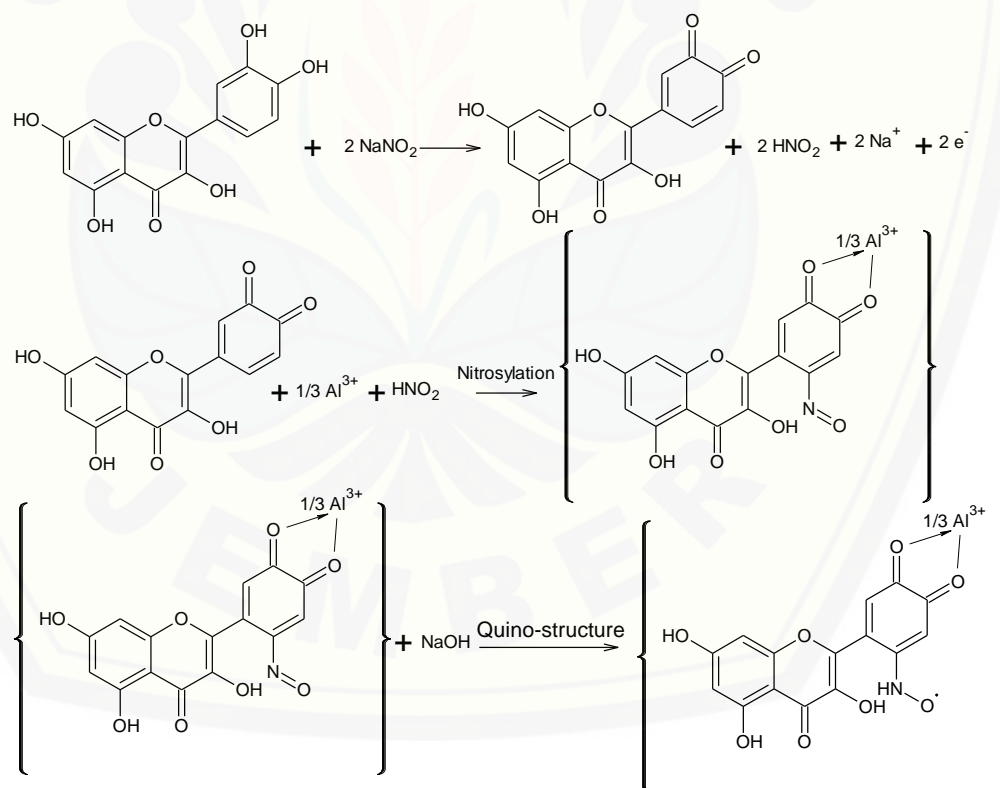


Ion fenolat yang telah terbentuk akan mereduksi satu atau lebih atom oksigen dari tungstat dan molibdat sehingga menghasilkan senyawa baru yang berwarna biru. Warna biru yang terbentuk memiliki panjang gelombang maksimum 750 nm.

2.10.2 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.

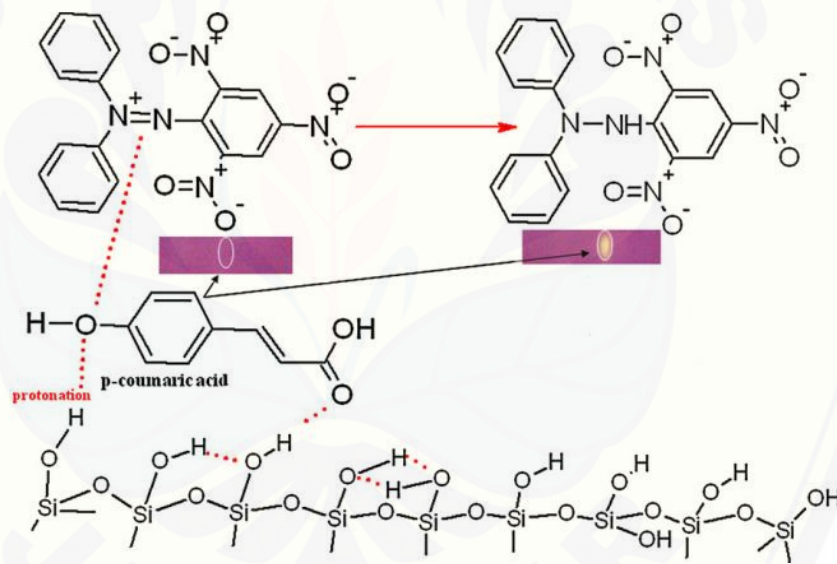
Gugus katekol kuersetin pada cincin B akan dioksidasi menjadi keton oleh natrium nitrit. Sementara natrium nitrit sendiri tereduksi menjadi asam nitrit. Kepekatan warna kuning dalam larutan akan meningkat ketika keton terbentuk. Gugus keton yang telah terbentuk akan mengompleks dengan kation alumunium (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 (Zhu *et al.*, 2009). Gambar 2.17 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 2.17 Reaksi pembentukan warna dari kuersetin (Zhu *et al.*, 2009)

2.10.3 Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

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 geraknya. 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 2.18 adalah mekanisme pembentukan ikatan hidrogen antara asam p-kumarat dengan silika yang dilengkapi dengan reaksinya.

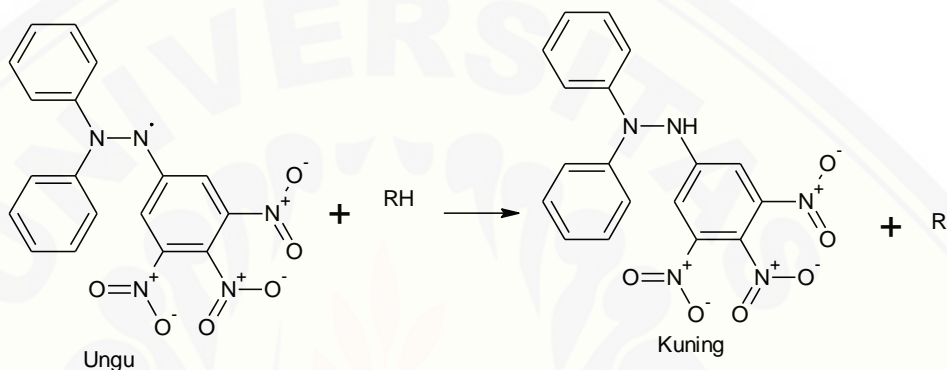


Gambar 2.18 Interaksi asam p-kumarat dengan silika gel dan DPPH (Ciesla *et al.*, 2012)

Perubahan warna dari ungu ke kuning pucat berbanding lurus dengan konsentrasi dan reaktivitas senyawa fenolik. Kekuatan senyawa fenolik dalam mereduksi reagen DPPH dilihat dari perubahannya.

2.10.4 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 2.19 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.

$$\text{Persen peredaman radikal} = \left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100\% \quad (\text{Persamaan 2.1})$$

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

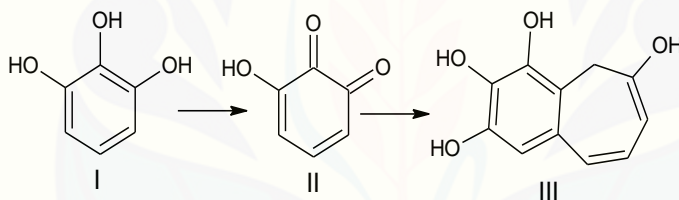
Nilai IC_{50} radikal DPPH dihitung melalui persamaan linear yang dihasilkan melalui pengeplotan antara % peredaman dan log konsentrasinya. Secara matematis persamaan untuk mendapatkan nilai IC_{50} adalah sebagai berikut:

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b} \quad (\text{Persamaan 2.2})$$

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

2.10.5 Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida

Analisis peredaman radikal anion superoksida secara spektrofotometri didasarkan pada reaksi autooksidasi pirogalol. Menurut Tauber (1953), reaksi autooksidasi pirogalol ditunjukkan oleh Gambar 2.20.



Gambar 2.20 Reaksi autooksidasi pirogalol (Tauber, 1953)

Pirogalol (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 pirogalol dan ortoquinon habis bereaksi. *Slope* reaksi autooksidasi pirogalol 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

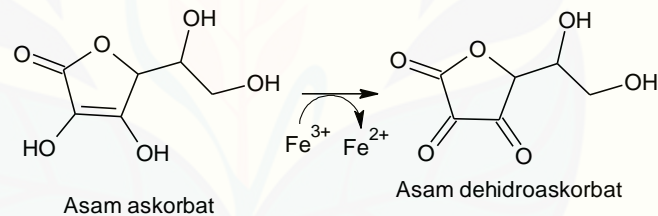
superoksida bereaksi dengan antioksidan tersebut sehingga nilai *slope* menjadi turun. Menurut Li *et al.* (2012), nilai persen peredaman radikal anion superoksida dapat dihitung melalui persamaan berikut:

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

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

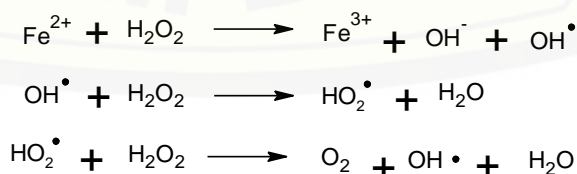
2.10.6 Analisis Peredaman Radikal Hidroksil

Radikal hidroksil dihasilkan melalui reaksi Fenton pada sistem yang terdiri atas Fe^{3+} -asam askorbat-EDTA- H_2O_2 (Gutteridge dan Halliwell, 1988). Ion Fe^{3+} yang mengompleks dengan EDTA akan direduksi oleh asam askorbat menjadi ion Fe^{2+} . Gambar 2.21 merupakan reaksi reduksi ion Fe^{3+} oleh asam askorbat.



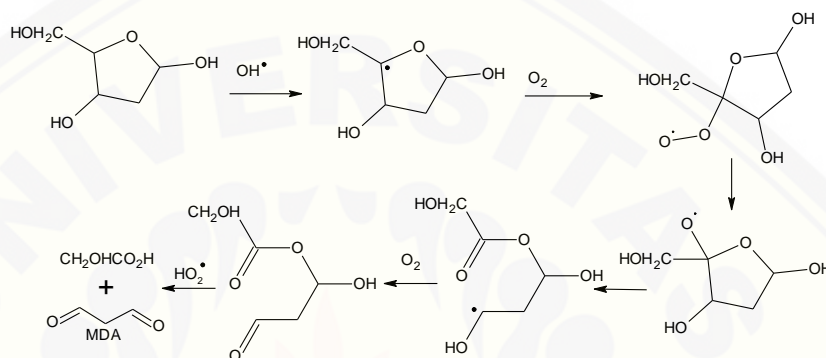
Gambar 2.21 Reaksi reduksi ion Fe^{3+} oleh asam askorbat

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

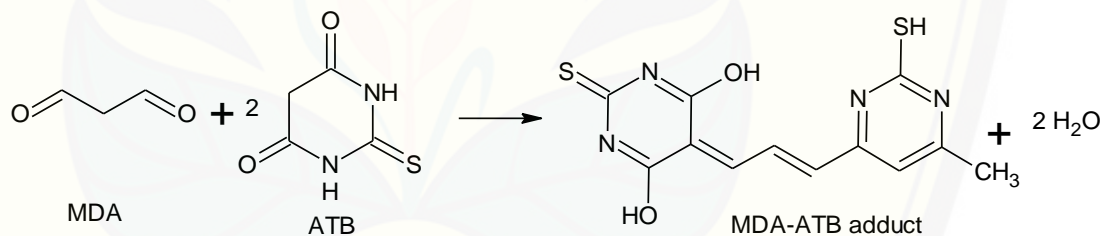


Radikal hidroksil yang telah terbentuk akan menyerang 2-deoksi-D-ribosa yang menghasilkan produk campuran. Gambar 2.22 merupakan reaksi antara radikal

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 2.23.



Gambar 2.22 Reaksi radikal hidroksil dengan 2-deoksi-D-ribosa

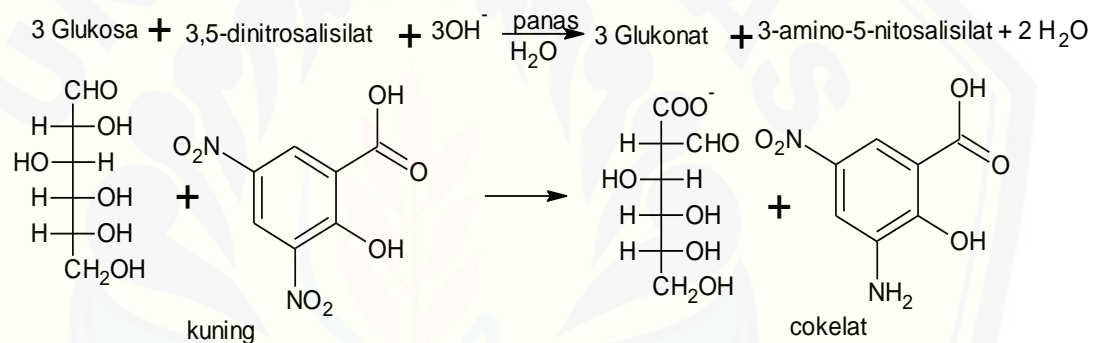


Gambar 2.23 Reaksi pembentukan MDA-ATB *adduct* yang berwarna pink

2.10.7 Analisis Penghambatan α -Amilase

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

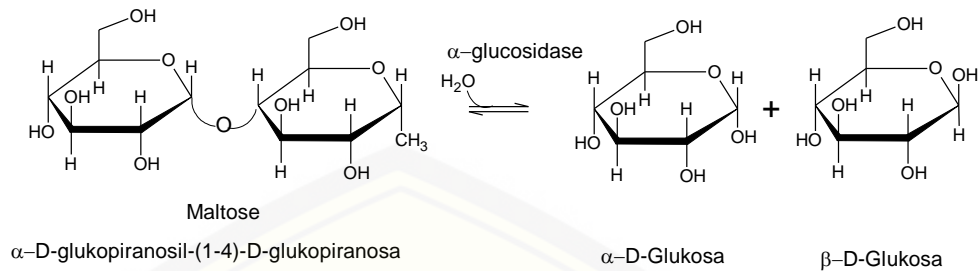
Reaksi hidrolisis α -amilase dapat dihentikan dengan pemanasan. Pemanasan menyebabkan perubahan konfigurasi dari α -amilase sehingga aktivitasnya hilang. Produk reaksi hidrolisis setelah dihentikan reaksinya ditentukan konsentrasinya dengan menggunakan reagen pewarna asam dinitrosalisilat (DNS). Reagen 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 2.24 merupakan reaksi reduksi DNS oleh salah satu gula reduksi yaitu glukosa.



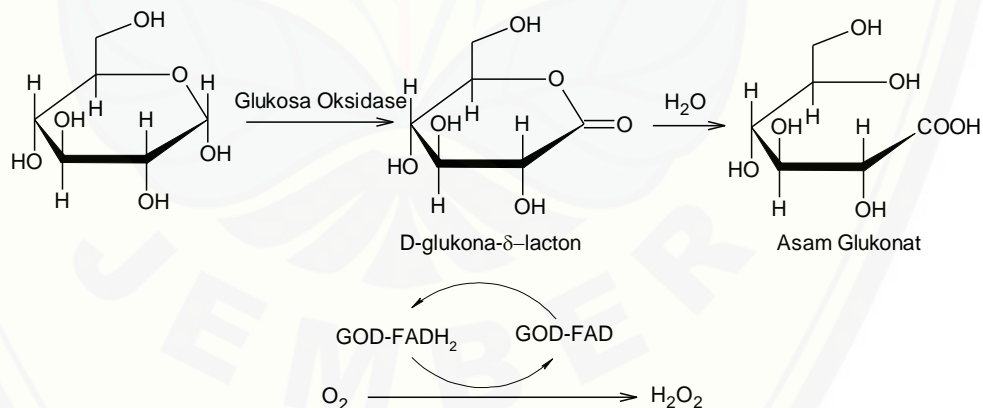
Gambar 2.24 Reaksi reduksi DNS dengan gula pereduksi (Timerman, Tanpa Tahun)

2.10.8 Analisis Penghambatan α -Glukosidase

Analisis penghambatan α -glukosidase didasarkan pada penurunan produk reaksi (glukosa) ketika ditambahkan inhibitor. Miyazawa *et al.* (2005), menggunakan maltosa sebagai substrat α -glukosidase. α -glukosidase akan menghidrolisis maltosa menjadi dua unit glukosa (Gambar 2.25).

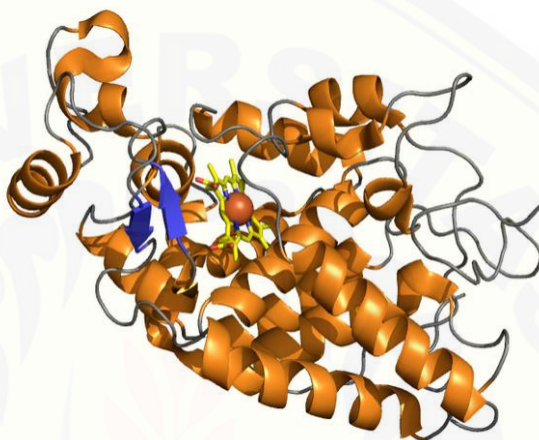
Gambar 2.25 Reaksi hidrolisis maltosa oleh α -glukosidase

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 2.26). Glukosa oksidase merupakan enzim flavoprotein dengan oksigen sebagai akseptor elektronnya. FAD yang merupakan kofaktornya akan direduksi menjadi FADH_2 selama reaksi oksidasi glukosa berlangsung. Sisi katalitik glukosa oksidase dari *Penicillium amagasakiense* diketahui berupa Tyr⁷³, Phe⁴¹⁸, Trp⁴³⁰, Arg⁵¹⁶, Asn⁵¹⁸, His⁵²⁰ dan His⁵⁶³ (Bankar *et al.*, 2009) (Gambar 2.27).

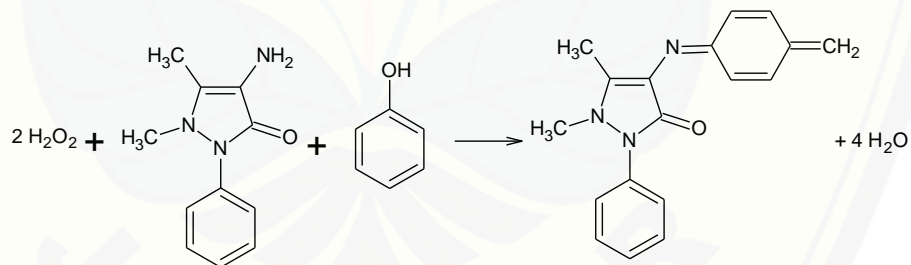
Gambar 2.26 Reaksi oksidasi glukosa oleh glukosa oksidase (Bankar *et al.*, 2009)

Hidrogen peroksida yang telah dihasilkan dari reaksi diatas direaksikan dengan 4-aminoantipirin (AmNH_2), fenol (PhOH), dan *horseradish peroxidase* (HRP) untuk menghasilkan warna (Vinodu & Padmanabhan, 2001). *Horseradish*

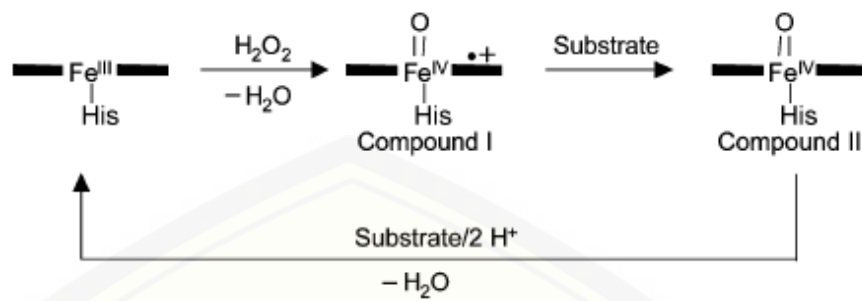
peroxidase (HRP) memiliki kation Fe^{2+} dipusatnya sehingga disebut *haem* (Gambar 2.27). Enzim ini memiliki residu katalitik His^{42} yang mengoksidasi substratnya sebagaimana ditunjukkan oleh Gambar 2.28. Produk dari reaksi ini menghasilkan *quinoneimine* yang berwarna pink dan memiliki panjang gelombang maksimum 500 nm. Mekanisme reaksi katalisisnya ditunjukkan oleh Gambar 2.29.



Gambar 2.27 Struktur 3D *horseradish peroxidase* (Vinodu & Padmanabhan, 2001)



Gambar 2.28 Reaksi oksidasi hidrogen peroksida oleh *horseradish peroxidase* (Vinodu & Padmanabhan, 2001)



Gambar 2.29 Mekanisme katalisis substrat oleh *horseradish peroxidase* (Katherine *et al.*, 2003)

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian akan dilakukan mulai bulan Januari 2015 sampai selesai di Laboratorium *Center for Development of Advance Science and Technology (C-DAST)* Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

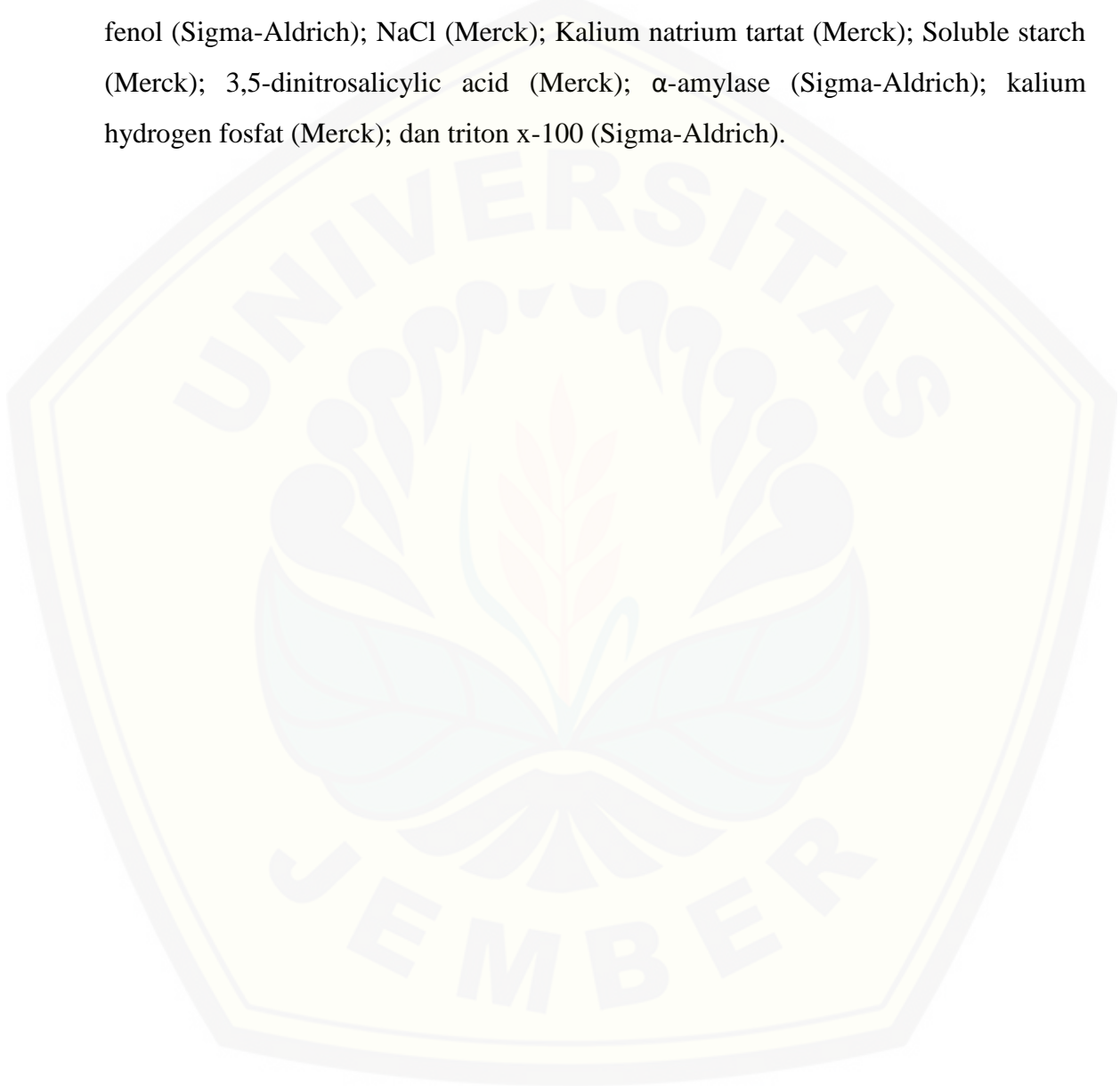
3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian digolongkan menjadi peralatan gelas, instrument, dan peralatan bukan gelas. Peralatan bukan gelas meliputi Erlenmeyer 500 mL, gelas ukur 250 mL, tabung reaksi, dan labu ukur 5, 10, dan 100 mL. Peralatan instrument meliputi blender, timbangan analitik, *vacuum evaporator*, *refrigator*, corong Buchner, pipet mikro, incubator, satu set alat spektrofotometer UV-Vis, *shaker*, dan sentrifugator. Sedangkan peralatan bukan gelas antara lain gunting, ayakan, plastik sampel, kertas label, kertas saring, aluminium foil, dan *eppendorf*, lempeng silica gel F₂₅₄.

3.2.2 Bahan

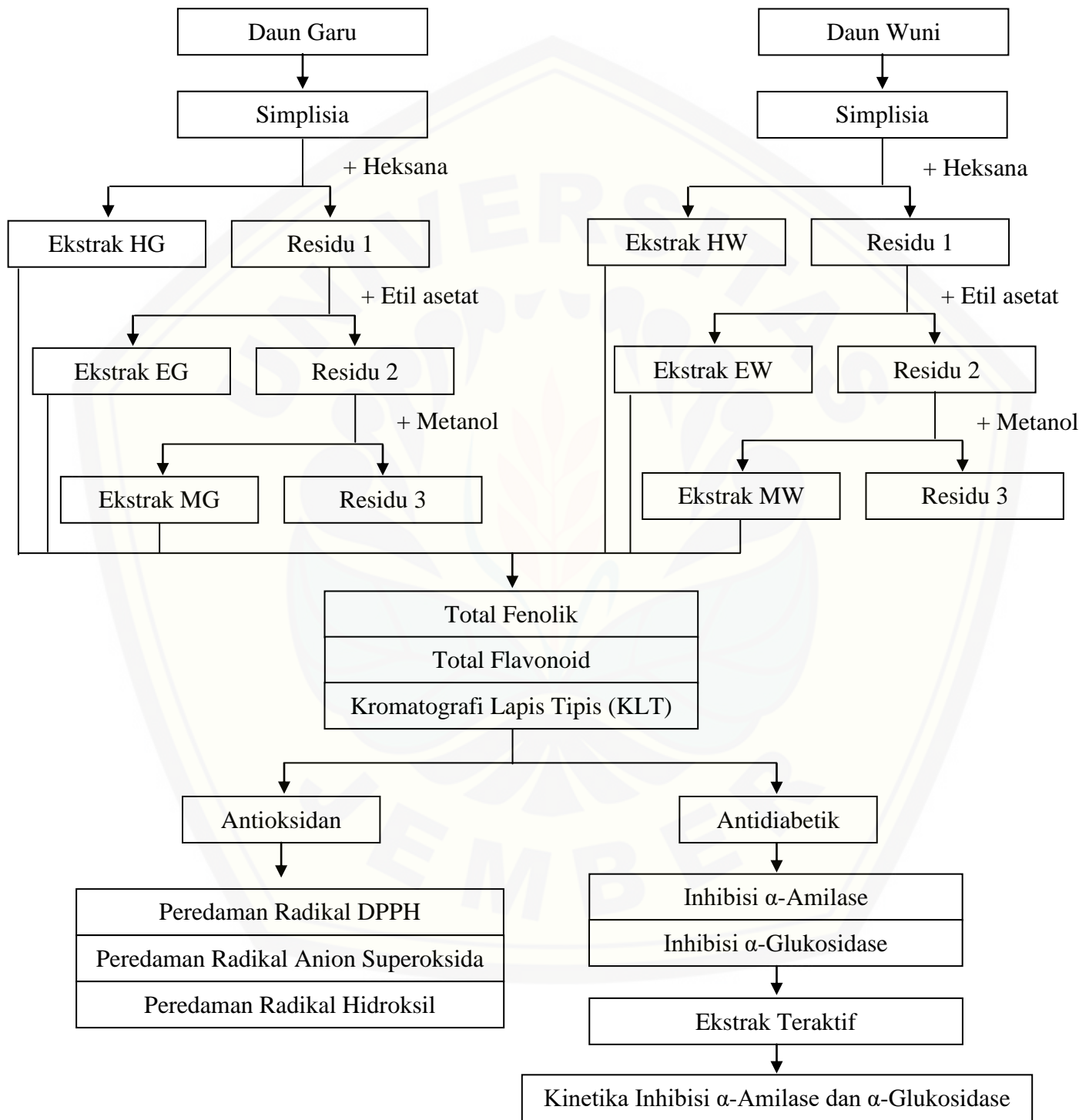
Daun wuni (*Antidesma bunius*); daun garu (*Antidesma montanum*); n-heksana pa (Merck); etil asetat pa (Merck); metanol pa (Merck); aquades; reagen Folin-Ciocalteu (Merck); Na₂CO₃ (Merck); asam galat (Sigma-Aldrich); NaNO₂ (Merck); AlCl₃ (Merck); NaOH (Merck); *quercetin* (nacalai tasque); *1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil* (DPPH) (nacalai tasque); etanol (Merck); vitamin C (nacalai tasque); *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) (nacalai tasque); FeCl₃ (Merck); H₂O₂ (Sigma-Aldrich); deoksiribosa (Sigma-Aldrich); kalium dihidrogen fosfat (Merck); asam trikloroasetat (Merck); asam tiobarbiturat (Merck); *pyragallol* (Sigma-Aldrich);

Trizma-base (nacalai tasque); HCL pa (Merck); sukrosa (Merck); DMSO (Merck); Na_2HPO_4 (nacalai tasque); *peroxidase* (Sigma-Aldrich); α -glukosidase (Sigma-Aldrich); *glucose oxidase* (Sigma-Aldrich); 4-aminoaniphyrine (Sigma-Aldrich); fenol (Sigma-Aldrich); NaCl (Merck); Kalium natrium tartat (Merck); Soluble starch (Merck); 3,5-dinitrosalicylic acid (Merck); α -amylase (Sigma-Aldrich); kalium hydrogen fosfat (Merck); dan triton x-100 (Sigma-Aldrich).



3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Diagram Alir Penelitian



3.4 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 *Sampling*

Pengambilan sampel dilakukan di Taman Nasional Meru Betiri Jember. Peralatan yang dibutuhkan untuk mengambil sampel seperti gunting tanaman, parang, pisau, dan golok serta wadah sampel yang berupa kresek hitam besar dan tanggung. Sampel yang diambil adalah bagian tanaman antara lain daun, batang, kulit batang, akar, bunga dan buah (jika ada). Sampel yang sudah didapat kemudian dimasukkan dalam wadah sampel dan diberi label sesuai dengan nama dan bagian tanaman.

3.4.2 Pembuatan Simplisia Daun Garu dan Wuni

Masing-masing bagian dari tanaman dipisahkan untuk kemudian dikeringkan pada ruang ber-AC selama satu minggu. Sampel yang sudah kering disortasi untuk memisahkan sampel yang kondisinya masih bagus dengan sampel yang sudah membusuk. Sampel terpilih kemudian dihaluskan dengan cara diblender hingga menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan 60 Mesh.

3.4.3 Ekstraksi Fenolik dari Simplisia Daun Garu dan Wuni

Ekstraksi fenolik dari simplisia daun garu dan wuni dilakukan dengan cara maeserasi. Ekstraksi dilakukan secara bertingkat dengan tiga jenis pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol. Tahapan ekstraksi dimulai dari pelarut yang non polar, yaitu n-heksana. Masing-masing simplisia kering sebanyak 50 gram dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 mL untuk kemudian ditambahkan pelarut n-heksana dengan perbandingan 1;5. Selanjutnya dilakukan pengadukan (shaker) selama 3 hari pada suhu ruang. Setelah itu disaring dengan corong Buchner dan dilanjutkan dengan evaporasi dengan evaporator vakum pada suhu 40°C. ekstrak yang didapat disimpan dalam *refrigator* untuk keperluan selanjutnya. Residu yang dihasilkan kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dan metanol dengan cara yang sama.

3.4.4 Penentuan Kandungan total Fenolik Ekstak Daun Garu dan Wuni

Penentuan total fenolik pada ekstrak sampel menggunakan metode yang dikemukakan oleh Taga *et al.* (1984) dan dihitung menggunakan asam gallat sebagai standart. Sebanyak 100 μL sampel ditambahkan kedalam 2 mL larutan Na_2CO_3 2%, (*w/v*) setelah 2 menit, ditambahkan 50% (*v/v*) reagen Folin-Ciocalteu. Hasil campuran divortex kemudian diinkubasi selama 30 menit. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 750 nm. Gallic acid digunakan sebagai standar. Satuan total fenol dalam mg *gallic acid equivalent* (GAE)/ gr sampel.

3.4.5 Penentuan Kandungan Total Flavonoid Ekstak Daun Garu dan Wuni

Penentuan kandungan total flavonoid didasarkan pada metode kolorimetri Al_2Cl_3 yang dikemukakan oleh Chang *et al.* (2002). Sebanyak 150 μL sampel dilarutkan ke dalam 400 μL aquadest. Kemudian dicampurkan dengan 30 μL NaNO_2 5% (*w/v*) setelah itu diinkubasikan selama 5 menit. Campuran tersebut kemudian ditambahkan 30 μL AlCl_3 10% lalu diinkubasikan selama 6 menit. Tambahkan 200 μL 1 N NaOH dan 240 μL aquadest ke dalam larutan tersebut. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 415 nm. *Quercetin* digunakan sebagai standar dengan satuan mg *quercetin equivalent* (QE)/gr sampel.

3.4.4 Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstak Daun Garu dan Wuni

Pengujian KLT didasarkan pada metode yang dilakukan oleh Wang *et al.* (2012). Ekstrak yang didapatkan dari masing-masing pelarut selanjutnya diidentifikasi secara kromatografi lapis tipis untuk menegaskan adanya senyawa kimia fenolik. Sebanyak 1,2 μL ekstrak dengan konsentrasi 1.0 μg GAE/ μL ditotolkan pada lempeng silica gel F_{254} sebanyak 7 kali dengan jarak penotolan 1 cm. plat silica hasil penotolan dimasukkan dalam *chamber* yang telah dijenuhkan oleh campuran eluen etil asetat; asam format; air (80;10;10, *v/v/v/v*) sampai terelusi 7,5 cm dari titik awal penotolan. Setelah itu hasil pemisahan dilihat dengan menggunakan

visualisator DPPH 0.03%. Bercak yang nampak kemudian dihitung harga Rf dengan rumus :

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut dari titik asal}}$$

3.4.7 Analisis Penangkapan Radikal DPPH Ekstak Daun Garu dan Wuni

Analisis peredaman radikal DPPH mengacu pada Soler-Rivas *et al.* (2000). Sebanyak 200 μL ekstrak dengan 5 konsentrasi yang berbeda dimasukkan ke dalam *microplate reader*. Setelah itu, ditambahkan 100 μL reagen DPPH 90 μM (dalam metanol) dan diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan spektrofotometer Uv-Vis pada 515 nm setelah 30 menit. Dihitung persen peredaman radikal DPPH pada masing-masing konsentrasi fenlik dan nilai IC_{50} . Vitamin C digunakan sebagai standar positifnya.

3.4.8 Analisis Penangkapan Radikal Anion Superoksida ($\cdot\text{O}_2^-$) oleh Ekstak Daun Garu dan Wuni

Aktivitas penangkapan radikal anion superoksida ditentukan berdasarkan autooksidasi *pyragallol* yang mengacu pada Tang *et al.* (2010). 100 μL larutan ekstrak dicampur dengan 1,8 mL buffer Tris-HCL 50 mM (pH 8,2). Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit, kemudian ditambahkan 100 μL *pyragallol* 10 mM (dilarutkan di dalam 10 mM HCL). Setelah 4 menit absorbansi larutan ditentukan pada 320 nm. Dihitung persen peredaman radikan anion superoksida. Digunakan vitamin C sebagai standar positif.

3.4.9 Analisis Penangkapan Radikal Hidroksil ($\cdot\text{OH}$) oleh Ekstak Daun Garu dan Wuni

Aktivitas penangkapan radikal hidroksil ditentukan dengan mengacu pada metode Halliwell dan Gutteridge (1999). Reaksi dimulai dengan menambahkan

campuran 50 μL 2-deoxy-2-ribose 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; 50 μL asam askorbat dimasukkan dalam *eppendorf* dan divortex. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C 1 jam. Setelah 1 jam, ditambahkan 500 μL asam trikloroasetat 2,8% dan 500 μL asam tiobarbiturat 1%. Campuran divortex dan diinkubasi lagi untuk menghasilkan warna pink pada suhu 100 °C selama 20 menit. Campuran didinginkan dan ditentukan absorbasinya pada 532 nm. Dihitung persen peredaman radikal hidroksil. Digunakan vitamin C sebagai standar positif.

3.4.10 Analisis Penghambatan α -Amilase oleh Ekstak Daun Garu dan Wuni

Analisis penghambatan α -Amilase dilakukan dengan mengacu pada (hashim *et al.*, 2013) yang dimodifikasi. Sebanyak 100 μL ekstrak dimasukkan ke dalam dua *eppendorf* yang dilabeli S^+ dan S^- . sebagai kontrol, 100 μL DMSO juga dimasukkan ke dalam dua *eppendorf* yang dilabeli C^+ dan C^- . sampel yang berlabel positif ditambahkan dengan 150 μL α -amilase (0,1 u/mL, dalam buffer fosfat pH 6,9), sedangkan sampel yang berlabel negative ditambahkan dengan 150 μL buffer fsfat pH 6,9. Campuran dipreinkubasi selama 15 menit pada 37°C setelah divortex. Kemudian, ditambahkan 250 μL *soluble starch* 1% (w/v) ke dalam sebuah *eppendorf*. Larutan diinkubasi selama 15 menit pada 37°C setelah divortex. Reaksi hidrolisis dihentikan dengan mendidihkan selama 1 menit. Setelah dingin, larutan dicosmosil dan diambil 160 μL dari masing-masing *eppendorf* untuk dimasukkan ke *eppendorf* lain dengan label yang sama. Sebanyak 80 μL reagen DNS ditambahkan ke dalam tiap-tiap *eppendorf*. Campuran dididihkan selama 15 menit. Kemudian, ditambahkan 720 μL akuades setelah dingin dan divortex. Dipipet 200 μL ke dalam *microplate reader* dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm. Akarbosa digunakan sebagai standar positifnya. Persen penghambatan α -amilase dihitung melalui persamaan berikut :

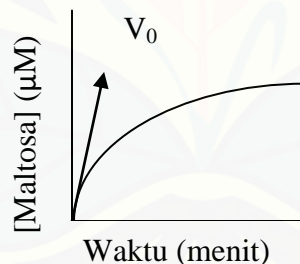
$$\text{Persen inhibisi} = \left(\frac{(C^+ - C^-) - (S^+ - S^-)}{(C^+ - C^-)} \right) \times 100\%$$

Keterangan :

C^+ = kontrol sampel dengan enzim, C^- = kontrol sampel tanpa enzim,. Sedangkan S^+ = sampel dengan enzim , dan S^- = sampel tanpa enzim

3.4.11 Kinetika Penghambatan α -Amilase

Kinetika penghambatan α -amilase dilakukan dengan mengacu pada metode poin 3.4.10 di atas tetapi ada variasi konsentrasi *soluble starch* yang digunakan adalah 0,5%; 0,25%; 0.125%; dan 0.0625%; 0,03125. pada masing-masing konsentrasi *soluble starch* dilakukan variasi waktu inkubasi yaitu 0; 3; 6; 9; 12; dan 18; menit untuk mendapatkan nilai kecepatan awal reaksinya (V_0). Nilai V_0 didapat dari pengeplotan antara waktu reaksi dan konsentrasi produk (maltose) yang dihasilkan. Gambar 3.1 merupakan bentuk kurva hasil pengeplotan antara waktu inkubasi dan konsentrasi maltose. Nilai V_0 sama dengan kemiringan dari kurva tersebut.



Gambar 3.1 Kurva hasil pengeplotan waktu inkubasi dan konsentrasi produknya

Nilai V_0 dari masing-masing konsentrasi *soluble starch* digunakan untuk membuat kurva Lineweaver-Burk. Kurva Lineweaver-Burk dibuat melalui pengeplotan antara $1/[\text{soluble starch}]$ dan $1/V_0$.

3.4.12 Analisis Penghambatan α -Glukosidase oleh Ekstak Daun Garu dan Wuni

Analisis penghambatan α -glukosidase dilakukan dengan mengacu pada (Miyazawa *et al.*, 2005) yang dimodifikasi. Sebanyak 100 μ L maltose 0.125 M dimasukkan ke dalam 4 *ependorf* yang berlabel C^+ , C^- , S^+ , S^- . sebanyak 100 μ L ekstrak dimasukkan ke dalam *ependorf* S^+ , dan S^- , sedangkan C^+ , dan C^- ditambahkan dengan 100 μ L DMSO. Setelah itu, 190 μ L buffer fosfat pH 7 ditambahkan ke dalam setiap *ependorf*. Campuran divortex dan ditambahkan 10 μ L α -glukosidase ke dalam *ependorf* C^+ dan S^+ , sedangkan C^- dan S^- ditambahkan akuabides. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam setelah divortex. Reaksi dihentikan dengan mendidihkannya selama 3 menit. Setelah dingin, dicosmosil dan hasilnya diambil 235 μ L. Sebanyak 750 μ L buffer fosfat pH 7 ditambahkan ke dalam setiap *ependorf* . Dilanjutkan dengan penambahan 5 μ L peroksidase (0,5 unit/ μ L), 5 μ L aminoantipirin (4 mg/mL), dan 5 μ L glukosa oksidase (0,8 unit/ μ L). Divortex dan dilanjutkan dengan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°c. hasil inkubasi dipipet 200 μ L dan dimasukkan ke dalam *microplate reader* untuk diukur absorbansinya pada 500 nm. Persen penghambatan α -glukosidase dihitung dengan persamaan yang digunakan untuk menghitung persen penghambatan α -amilase. Akarbose digunakan sebagai standar positifnya.

3.4.13 Kinetika Penghambatan α -Glukosidase oleh Ekstak Daun Garu dan Wuni

Kinetika Penghambatan α -glukosidase dilakukan dengan metode poin 3.4.12 di atas tetapi ada variasi konsentrasi maltose dan waktu inkubasi. Konsentrasi maltose yang digunakan adalah 1M; 0,5M; 0,25M; 0.125M; dan 0.0625M. Pada masing-masing konsentrasi substrat dilakukan variasi waktu inkubasi yaitu 0; 10; 20; 40; 60; dan 80 menit untuk mendapatkan kecepatan awal reaksinya (V_0). Nilai V_0 didapat dari pengeplotan antara waktu reaksi dan konsentrasi produk (glukosa) yang dihasilkan. Gambar 3.2 merupakan bentuk kurva hasil pengeplotan antara waktu