

Bab VI Hasil dan Pembahasan

VI. 1 Penyiapan Bahan

Penyiapan bahan yang dilakukan meliputi proses pengumpulan bahan tanaman, determinasi tanaman, dan pengolahan bahan hingga menjadi simplisia. Bahan tanaman yang digunakan yaitu bagian bunga kecombrang yang diperoleh dari Majalaya, Bandung. Untuk memastikan dan meyakinkan bahwa tanaman uji yang digunakan merupakan tanaman kecombrang, maka dilakukan determinasi tanaman oleh peneliti di Herbarium Bandungense SITH (Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati), Institut Teknologi Bandung. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman uji merupakan kecombrang dengan nama jenis/spesies *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Sm. yang termasuk dalam famili *Zingiberaceae* (Lampiran B).

Pada penyiapan simplisia bunga kecombrang yang diperoleh dilakukan pemisahan dari bagian yang tidak digunakan atau pengotor kemudian dilakukan pencucian dengan air mengalir untuk membersihkan kotoran yang menempel. Bunga yang sudah bersih dilakukan perajangan untuk memperluas permukaan yang akan mempercepat dalam proses pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan menggunakan oven pada suhu 40⁰C sehingga diperoleh simplisia kering.

VI.2 Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi simplisia merupakan salah satu parameter untuk standarisasi simplisia yang bertujuan untuk mengetahui mutu suatu simplisia yang digunakan. Karakterisasi yang dilakukan meliputi

kadar abu total, kadar abu larut air, kadar abu tidak larut asam, susut pengeringan, kadar sari larut air, dan kadar sari larut etanol. Hasil pemeriksaan karakterisasi sampel bunga kecombrang (*Etlintera elatior*) dapat dilihat pada tabel sebagai berikut:

Tabel VI.1 Hasil karakterisasi simplisia bunga kecombrang (*Etlintera elatior*)

Parameter	Hasil % (^b/_b)
Kadar Abu Total	13,04
Kadar Abu Larut Air	11,69
Kadar Abu Tidak Larut Asam	3,07
Susut Pengeringan	11,15
Kadar Sari Larut Air	10
Kadar Sari Larut Etanol	2,83

Pemeriksaan kadar abu total bertujuan untuk memberi gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai diperoleh simplisia baik berasal dari tanaman maupun selama proses. Selain pemeriksaan kadar abu total dilakukan juga pemeriksaan kadar abu larut air dan kadar abu tidak larut asam. Kadar abu larut air untuk mengetahui jumlah kandungan mineral berasal dari tanaman itu sendiri (internal) seperti mineral-mineral hara tanah yang diserap tanaman untuk memenuhi kebutuhannya, sedangkan kadar abu tidak larut asam untuk mengetahui kandungan non fisiologis ekstrinsik seperti silikat yang berasal dari pasir yang menempel. Susut pengeringan bertujuan untuk memberikan gambaran batasan maksimal (rentang) besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Penetapan kadar sari bertujuan untuk mengetahui jumlah kandungan senyawa dalam simplisia yang tersari dalam pelarut tertentu, dimana kadar sari larut air menunjukkan

minimal senyawa yang dapat tersari dalam air dan kadar sari larut etanol menunjukkan minimal senyawa yang dapat tersari dalam etanol.

VI.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan tahapan awal yang dilakukan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalam simplisia secara kualitatif. Skrinning fitokimia yang dilakukan meliputi pemeriksaan golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, dan steroid/triterpenoid. Hasil skrinning fitokomia simplisia bunga kecombrang dapat dilihat pada tabel sebagai berikut:

Tabel VI.2 Hasil skrining fitokimia simplisia bunga kecombrang (*Etlintera elatior*)

Golongan Senyawa	Hasil Pengujian
Alkaloid	-
Flavonoid	+
Saponin	+
Tanin	+
Kuinon	+
Steroid/Triterpenoid	+

Keterangan :

(+) : Mengandung golongan senyawa yang diuji

(-) : Tidak mengandung golongan senyawa yang diuji

VI.4 Pembuatan Ekstrak dan Fraksi

Simplisia bunga yang diperoleh selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran untuk memperluas luas permukaan kontak antara simplisia dengan pelarut. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% selama 3x24 jam. Hasil maserasi

disaring, sehingga diperoleh ekstrak cair bunga kecombrang (*Etlingera elatior*). Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan alat *rotary vaporator* sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental bunga kecombrang didapat sebanyak 53,30 g dengan rendemen ekstrak sebanyak 10,66 %.

Ekstrak kental yang didapat dilakukan fraksinasi dengan metode ekstraksi cair – cair (ECC), fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya. Ekstrak kental diambil 15 g dilarutkan dengan methanol – air (2:8), kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan dilakukan pengocokkan dengan pelarut n-heksan untuk menarik senyawa yang bersifat non polar, etil asetat untuk menarik senyawa yang bersifat semi polar yang dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Masing – masing fraksi dipekatkan dengan *rotary vaporator* dan dihitung rendemennya. Didapatkan hasil rendemennya sebagai berikut :

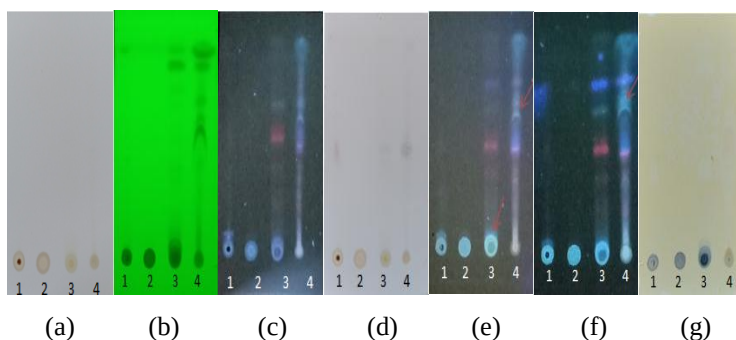
Tabel VI.3 Hasil rendemen fraksi bunga kecombrang (*Etlingera elatior*)

Sampel	Berat Fraksi (gram)	Rendemen (%)
Fraksi metanol air	8,67	57,79
Fraksi etil asetat	0,38	2,49
Fraksi n-heksan	1,04	6,94

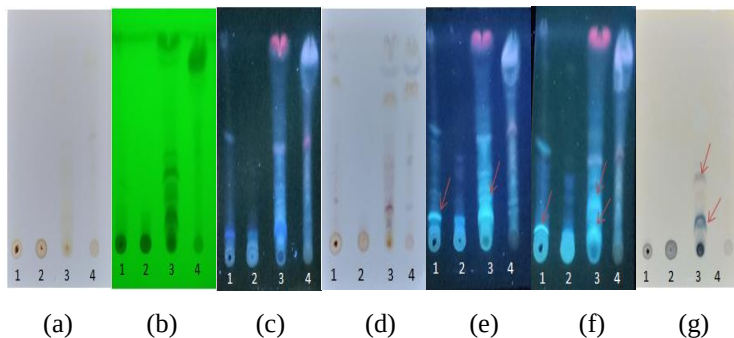
VI.5 Pemantauan Ekstrak dan Fraksi dengan Kromatografi Lapis Tipis

Pemantauan ekstrak dan fraksi dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi secara kualitatif dengan memisahkan komponen-komponen sampel

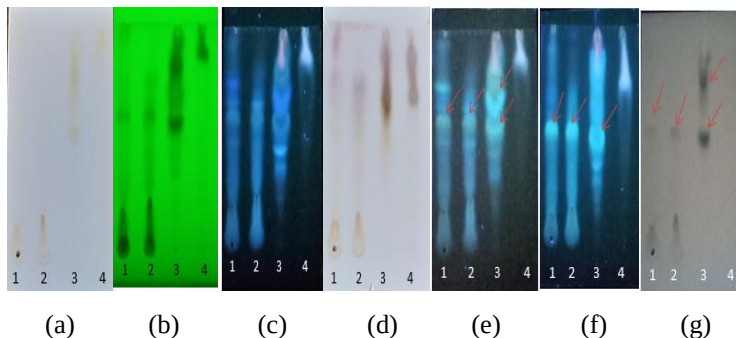
berdasarkan perbedaan kepolaran. Pada proses ini fase diam yang digunakan untuk KLT adalah silika gel F_{254} dan fase gerak yang digunakan untuk pengembang non polar adalah n-heksana : etil asetat (8:2), pengembang semi polar yaitu klorofom : metanol (9:1) dan pengembang polar yaitu n-butanol : asam asetat : air (4:1:5). Hasil KLT dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar VI.1 Kromatografi lapis tipis (1) ekstrak, (2) fraksi metanol air, (3) fraksi etil asetat, (4) fraksi n-heksan, fase diam silika gel F_{254} , fase gerak non polar (n-heksan : etil asetat) 8:2, (a) visual, (b) sinar UV 254nm, (c) sinar UV 365nm, (d) penampak bercak H_2SO_4 10%, (e) penampak bercak $AlCl_3$ 5%, (f) penampak bercak sitroborat, (g) penampak bercak $FeCl_3$ 10%.



Gambar VI.2 Kromatografi lapis tipis (1) ekstrak, (2) fraksi metanol air, (3) fraksi etil asetat, (4) fraksi n-heksan, fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak semi polar (kloroform : metanol) 9:1, (a) visual, (b) sinar UV 254nm, (c) sinar UV 365nm, (d) penampak bercak H₂SO₄ 10%, (e) penampak bercak AlCl₃ 5%, (f) penampak bercak sitroborat, (g) penampak bercak FeCl₃ 10%.



Gambar VI.3 Kromatografi lapis tipis (1) ekstrak, (2) fraksi metanol air, (3) fraksi etil asetat, (4) fraksi n-heksan, fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak polar n-butanol : asam asetat : air (4:1:5), (a) visual, (b) sinar UV 254nm, (c) sinar UV 365nm, (d) penampak bercak H₂SO₄ 10%, (e) penampak bercak AlCl₃ 5%, (f) penampak bercak sitroborat, (g) penampak bercak FeCl₃ 10%.

Pemantauan ekstrak dan fraksi bunga kecombrang menggunakan kromatografi lapis tipis menunjukkan adanya spot kuning kehijauan dibawah sinar lampu UV 365 nm setelah disemprot dengan pereaksi AlCl_3 5% dan sitroborat yang menandakan adanya senyawa flavonoid pada ekstrak dan fraksi (gambar VI.1 (e) (f) ; 6.2 (e) (f); 6.3 (e) (f)), selain itu dilakukan juga penyemporatan dengan penampak bercak FeCl_3 10% menunjukkan adanya spot yang berwarna hitam dengan berlatar kuning ketika dilihat secara visual menandakan adanya senyawa fenol (gambar VI.2 (g) ; 6.3 (g)).

VI.6 Uji Aktivitas Inhibitor Enzim α -glukosidase

Pengujian aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase dilakukan berdasarkan prinsip dasar reaksi enzimatik, yakni terjadinya hidrolisis substrat *p*NPG oleh enzim α -glukosidase menjadi *p*-nitrofenol (warna kuning) dan glukosa (Holidah dkk., 2018). Besarnya hambatan dari ekstrak dan fraksi dapat dilihat dari berkurangnya *p*-nitrofenil yang terbentuk bila dibandingkan dengan aktivitas enzim awal. Sehingga semakin baik daya hambat oleh ekstrak dan fraksi, maka intensitas warna kuning yang terbentuk pada larutan uji akan semakin berkurang, sehingga akan menyebabkan semakin kecilnya nilai absorbansi pada larutan uji. Itulah yang mendasari pengukuran nilai penghambatan enzim α -glukosidase oleh ekstrak dan fraksi bunga kecombrang.

VI.6.1 Optimasi Konsentrasi Enzim α -glukosidase

Optimasi konsentrasi enzim dilakukan untuk menentukan konsentrasi enzim yang bekerja secara optimum pada reaksi enzimatik. Pengujian optimasi dilakukan dengan cara memasukkan

variasi konsentrasi enzim α -glukosidase 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 dan 0,8U/mL dengan konsentrasi substrat yang digunakan adalah 15 mM dan dapar fosfat pH 6,8. Inkubasi dilakukan dua tahap, pertama di inkubasi selama 15 menit untuk memberikan waktu agar larutan uji mencapai suhu 37⁰C dan inkubasi tahap kedua selama 15 menit yang merupakan inkubasi untuk reaksi enzimatis kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan natrium karbonat (Susilawati dkk., 2017). Produk yang dihasilkan dari reaksi antara α -glukosidase dan pNPG diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

Tabel VI.4 Hasil optimasi konsentrasi enzim

Konsentrasi (U/mL)	Kontrol (K)	Blanko Kontrol (BK)	Absorbansi
0,2	0,271	0,065	0,206
0,3	0,646		0,581
0,4	0,862		0,797
0,5	1,673		1,608
0,6	1,968		1,903
0,7	2,212		2,147
0,8	3,755		3,690

Dari hasil variasi konsentrasi enzim didapat konsentrasi enzim yang optimum adalah 0,4 U/mL dengan absorbansi 0,797 untuk digunakan uji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase.

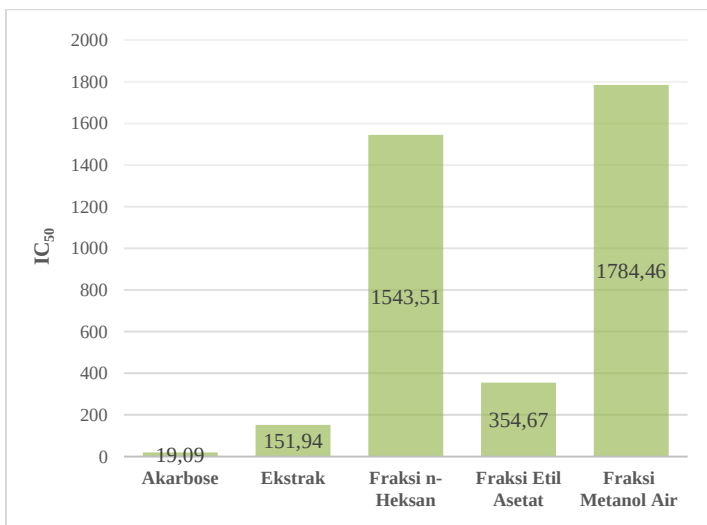
VI.6.2 Pengujian Aktivitas Penghambatan Enzim (Sampel)

Pengujian aktivitas penghambatan enzim dilakukan pada sampel ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi metanol air bunga kecombrang dengan beberapa konsentrasi yang berbeda.

Pengujian juga dilakukan terhadap akarbose sebagai obat pembanding yang merupakan agen penghambat enzim α -glukosidase yang secara umum digunakan dalam pengobatan diabetes melitus tipe 2 (Arumugram dkk., 2014).

Pengujian ini dilakukan terhadap kontrol, sampel uji dan blanko, pengukuran terhadap kontrol dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim awal sebelum adanya penghambatan oleh larutan uji. Sampel uji bertujuan melihat aktivitas penghambatan enzim oleh larutan uji, sedangkan pengujian terhadap larutan blanko bertujuan mengoreksi serapan yang dihasilkan oleh larutan uji, hal ini perlu dilakukan karena serapan yang dihasilkan bisa saja tidak murni, karena dapat disebabkan oleh larutan uji yang berwarna sehingga memberikan serapan pada panjang gelombang visibel (Marliani dkk., 2015).

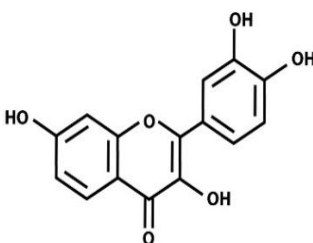
Besarnya aktivitas inhibisi setiap rentang konsentrasi dilihat dari persen inhibisi yang dihasilkan. Persen inhibisi menunjukkan jumlah persentase enzim yang terhambat oleh sejumlah dosis atau konsentrasi sampel, dimana semakin besar persen inhibisi yang dihasilkan maka semakin banyak aktivitas enzim yang dihambat. Kekuatan dari suatu sampel dalam menghambat aktivitas enzim digambarkan dengan nilai IC_{50} yaitu konsentrasi yang menghambat 50% aktivitas enzim. Semakin kecil nilai IC_{50} yang diperoleh maka semakin kuat sampel tersebut dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase.



Gambar VI.4 Perbandingan nilai IC₅₀ akarbose, ekstrak dan fraksi bunga kecombrang (*Etlingera elatior*)

Dilihat dari hasil nilai IC₅₀ antara sampel ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi metanol air bunga kecombrang yang memiliki penghambatan terhadap enzim α -glukosidase yang paling baik yaitu sampel ekstrak bunga kecombrang dengan nilai IC₅₀ yang paling kecil sebesar 151,94 $\mu\text{g/mL}$, dimana semakin kecil nilai IC₅₀ menandakan bahwa daya hambatnya semakin kuat. Tetapi jika dibandingkan dengan pembandingnya akarbose sampel ekstrak bunga kecombrang daya penghambatannya masih dibawah akarbose dengan nilai IC₅₀ akarbose sebesar 19,09 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini kemungkinan senyawa yang diduga mampu menghambat enzim α -glukosidase seperti flavonoid tidak terlalu kuat atau kadarnya terlalu rendah.

Senyawa metabolit sekunder yang berperan dalam aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase yaitu flavonoid. Gugus hidroksil yang terdapat dalam struktur flavonoid memiliki peran penting dalam menghambat enzim α -glukosidase, terutama pada posisi 3 di cincin C flavonoid akan berinteraksi dengan enzim α -glukosidase sehingga aktivitas enzim tersebut menjadi terhambat (Tadera, dkk., 2006).



Gambar VI.5 Struktur Flavonoid
(Redha, 2010)

Gugus hidroksi pada cincin A dan cincin B juga dapat meningkatkan kemampuan inhibisi enzim α -glukosidase, dimana pada gugus C3' dan C4' dihidroksi cincin B berperan dalam interaksi dengan sisi aktif dari enzim α -glukosidase melalui ikatan hidrogen. Sedangkan, adanya gugus OH pada C3' berfungsi untuk mempertahankan flavonoid terikat pada sisi aktif enzim α -glukosidase secara tepat. Oksigen yang terdapat pada gugus hidroksil di C3', C4' pada cincin B dan C3 pada cincin C berperan dalam berikatan dengan hidrogen dari sisi aktif enzim α -glukosidase (Xu, H. 2010; Wang, dkk., 2010).

Flavonoid juga dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan kemampuannya sebagai zat antioksidan. Flavonoid bersifat protektif terhadap kerusakan sel β sebagai penghasil insulin serta dapat mengembalikan sensitivitas reseptor insulin pada sel dan bahkan meningkatkan sensitivitas insulin (Winarsi dkk., 2012). Mekanisme lain dari flavonoid yang menunjukkan efek hipoglikemik yaitu mengurangi penyerapan glukosa dan mengatur aktivitas ekspresi enzim yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat (Brahmachari, 2011).