

Bab VI Hasil dan Pembahasan

VI.1. Penyiapan Bahan dan Determinasi Tanaman

Bahan berupa simplisia daun dan batang paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) yang didapat dari Plaju, Palembang. Dilakukan determinasi dari tanaman yang akan diuji. Determinasi tanaman bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas tanaman tersebut sehingga kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan diteliti dapat dihindari. Determinasi tanaman dilakukan di Institut Teknologi Bandung. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman uji merupakan tanaman paliasa dengan nama jenis/ spesies *Kleinhovia hospita* L. Yang termasuk dalam famili *Sterculiaceae* (Lampiran B).

VI.2. Pengolahan Bahan

Penyiapan simplisia meliputi proses pencucian, pemisahan bagian tanaman menjadi bagian daun dan batang, kemudian masing-masing bagian tanaman dicuci untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada tanaman. Kemudian masing-masing bagian dipotong-potong untuk memperluas permukaan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 40 °C. Hasil pengeringan dari daun paliasa segar sebanyak 4 kg diperoleh 1,3 kg simplisia kering, sedangkan batang paliasa segar sebanyak 5 kg diperoleh 2 kg simplisia kering. Selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran partikel hingga diperoleh serbuk simplisia daun dan batang paliasa.

VI.3. Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi simplisia bertujuan untuk mengetahui kualitas dan mutu simplisia yang digunakan. Karakterisasi simplisia yang dilakukan; susut pengeringan, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar sari larut air dan penetapan kadar sari larut etanol.

Tabel VI.1 Hasil Karakterisasi Simplisia Daun dan Batang Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.)

Karakterisasi	Daun (%b/b)	Batang (%b/b)
Susut Pengeringan	8,06	8,40
Kadar Sari Larut Air	19,80	3,74
Kadar Sari larut Etanol	9,85	2
Kadar Abu Total	10,55	2,70
Kadar Abu Tidak Larut Asam	2,51	0,81

Susut pengeringan dilakukan bertujuan untuk menetapkan jumlah semua jenis bahan yang mudah menguap dan hilang pada kondisi tertentu (Depkes RI, 2000). Susut pengeringan juga bertujuan untuk menjaga kualitas simplisia yaitu menentukan komponen senyawa yang menguap selain air pada proses pengeringan pada suhu 105 °C. Pada pengujian susut pengeringan simplisia daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) sebesar 8,06% b/b sedangkan pada batang paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) sebesar 8,40% b/b. Hasil ini menunjukkan bahwa pada batang paliasa lebih banyak mengandung senyawa yang dapat hilang pada proses pengeringan dengan suhu 105 °C jika dibandingkan dengan daunnya.

Penetapan kadar sari bertujuan untuk mengetahui jumlah kandungan senyawa dalam simplisia yang dapat tersari dalam pelarut tertentu. Nilai kadar sari larut air pada daun dan batang paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) berturut-turut sebesar 19,8% b/b dan 3,74% b/b dan lebih tinggi dibandingkan dengan kadar sari larut etanol yaitu 9,85% b/b dan 2% b/b. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah kandungan senyawa yang terlarut dalam air lebih besar pada daun maupun batang paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) dibandingkan dengan jumlah kandungan senyawa yang terlarut dengan etanol.

Penetapan kadar abu total bertujuan untuk menunjukkan total kandungan mineral dalam suatu bahan. Komponen-komponen organik dalam proses pembakaran akan terbakar, tetapi komponen anorganiknya masih tertinggal. Penetapan kadar abu total dilakukan pada suhu 600 °C sampai simplisia di dalam krus mengabu ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi putih. Hasil penetapan kadar abu total daun dan batang paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) berturut-turut sebesar 10,55% b/b dan 2,7% b/b. Kadar abu tidak larut asam menunjukkan komponen anorganik yang berasal dari luar tanaman. Hasil penetapan kadar abu tidak larut asam daun dan batang paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) berturut-turut sebesar 2,51% b/b dan 0,81% b/b.

VI.4 Penapisan Fitokimia

Penapisan Fitokimia bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam simplisia daun dan batang paliasa (*Kleinhovia hospita* L.). Penapisan fitokimia yang dilakukan meliputi pengujian alkaloid, flavonoid, saponin, tanin,

kuinon, dan steroid/triterpenoid. Hasil penapisan fitokimia simplisia dapat dilihat pada tabel VI.2.

Tabel VI.2 Penapisan Fitokimia Simplisia Daun dan Batang paliasa (*Kleinhovia hospita* L.)

Golongan Senyawa	Ekstrak <i>Kleinhovia hospita</i> L.	
	Daun	Batang
Alkaloid	-	-
Flavonoid	+	+
Saponin	+	-
Tanin :		
FeCl	+	+
Gelatin	+	+
Stiasny	-	-
Kuinon	+	+
Steroid/Triterpenoid	+/-	-/-

Keterangan : + = mengandung golongan senyawa yang diuji

- = tidak mengandung golongan senyawa yang diuji

Pada analisis skrining fitokimia, komponen yang terdapat dalam simplisia pada uji Mayer dan uji Dragendorf diperoleh hasil negatif. Penambahan amoniak 25% untuk melepaskan alkaloid menjadi basa bebas kemudian ditambahkan kloroform. Filtrat diekstraksi cair-cair dengan HCl karena alkaloid bersifat basa sehingga biasanya diekstrak dengan pelarut yang asam (Harborn, 1996). Bila positif setelah ditambahkan pereaksi Mayer terbentuk endapan putih. Adanya protein yang mengendap pada penambahan pereaksi Mayer yang dapat memberikan reaksi positif palsu pada beberapa senyawa. Pada uji Mayer, nitrogen akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium alkaloid

yang mengendap. Pada uji dragendorff akan menunjukkan hasil positif dengan ditandai terbentuk endapan coklat muda hingga kuning dimana endapan tersebut adalah kalium alkaloid. Hal ini disebabkan karena dalam pembuatan pereaksi dragendorff, bismuth nitrat yang ditambahkan dilarutkan dalam HCl agar tidak terjadi reaksi hidrolisis.

Pada pemeriksaan flavonoid diketahui bahwa sampel positif mengandung flavonoid. Hasil ini ditunjukkan dengan adanya perubahan warna setelah diberi pereaksi Mg-HCl dan amil alkohol, kemudian dibandingkan dengan kontrol. Penambahan HCl pekat dalam uji flavonoid digunakan untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil. Glikosil akan tergantikan oleh H^+ dari asam karena sifatnya yang elektrofilik. Glikosida berupa gula yang biasa dijumpai yaitu glukosa, galaktosa, raminosa. Reduksi dengan Mg dan HCl pekat ini menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga pada flavonol, flavon, dan xanton. Kemudian dihilangkan lapisan amil alkoholnya yang akan dilanjutkan untuk uji kuinon. Filtrat ditambahkan NaOH menunjukkan hasil positif kuinon.

Pada pemeriksaan saponin, timbulnya busa disebabkan saponin mengandung senyawa yang sebagian larut dalam air (hidrofilik) dan senyawa yang larut dalam pelarut non polar (hidrofobik) surfaktan yang dapat menurunkan tegangan permukaan.

Pada pemeriksaan tannin, sampel dibagi dalam 3 bagian. Filtrat A ditambahkan FeCl_3 , memberikan hasil positif mengandung fenol karena terjadi perubahan warna yaitu hijau kehitaman. Perubahan warna ini disebabkan oleh reaksi FeCl_3 dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tannin yang akan membentuk senyawa kompleks. Filtrat B ditambahkan gelatin dan memberikan hasil positif. Hal ini disebabkan oleh adanya tanin akan mengendapkan protein pada gelatin (Marliana, 2005). Tanon bereaksi dengan gelatin membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air. Filtrat C ditambahkan pereaksi stiasny lalu dipanaskan dan diperoleh hasil negatif. Hasil positif tanin katekat akan terbentuk endapan merah, kemudian disaring.

Pada pemeriksaan steroid triterpenoid dengan pereaksi Liebermann-Burchard memberikan hasil positif steroid. Senyawa terpen umumnya senyawa yang larut dalam lemak. Maka berdasarkan tingkat kelarutannya, didalam pengujian, terpen ditarik dengan eter.

VI.5. Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan adalah refluks bertingkat dengan tiga pelarut yang kepolarannya berbeda, yaitu n-Heksana, etil asetat, dan etanol 96%. Proses Ekstraksi ini bertujuan untuk menarik senyawa berdasarkan dengan kepolarannya. Selain itu, metode ini digunakan untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang relatif lebih banyak. Pada proses ekstraksi digunakan perbandingan simplisia dan pelarut adalah 1 : 6. Ekstrak yang diperoleh dari proses refluks dikumpulkan, lalu dikentalkan menggunakan *rotary vaporator* yang

dilengkapi dengan pompa vakum. Dengan adanya pompa vakum proses penguapan dilakukan dibawah titik didih pelarut sehingga proses penguapan lebih cepat. Penguapan pelarut dilakukan dibawah titik didihnya yaitu 40 °C agar senyawa aktif yang terkandung tidak rusak karena adanya pemanasan.

Tabel VI.3 Hasil rendemen ekstrak dapat dilihat dalam tabel dibawah ini :

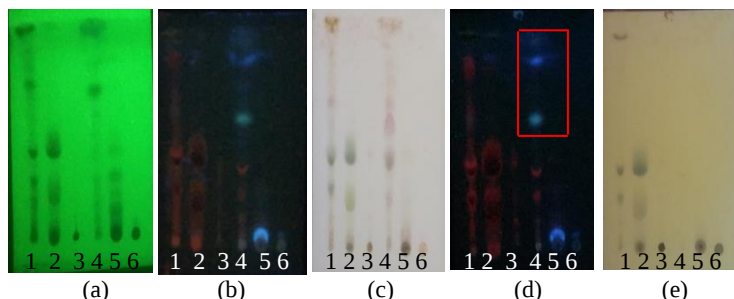
Sampel		Bobot Simplisia (gram)	Ekstrak Kental (gram)	Rendemen (%)
Daun Paliasa (<i>Kleinhovia hospita</i> L.)	n- Heksana	200	2,94	1,47
	Etil asetat	200	5,00	2,50
	Etanol 96%	200	6,43	3,21
Batang Paliasa (<i>Kleinhovia hospita</i> L.)	n-Heksana	400	0,31	0,08
	Etil asetat	400	0,53	0,13
	Etanol 96%	400	2,91	0,73

Dari hasil percobaan diketahui bahwa rendemen ekstrak daun dan batang yang paling besar adalah ekstrak etanol 96%. Hal ini menunjukkan bahwa dalam simplisia banyak mengandung senyawa yang terlarut dalam etanol 96%.

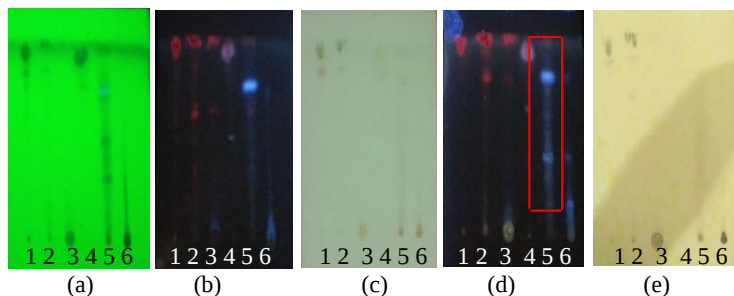
VI.6. Pemantauan Ekstrak

Pemantauan ekstrak dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa dalam ekstrak secara kualitatif menggunakan metode kromatografi lapis tipis. Fase diam yang digunakan adalah silika gel F₂₅₄, dan fase geraknya menggunakan tiga eluen dengan tingkat kepolaran yang berbeda untuk melihat bercak yang terbentuk pada

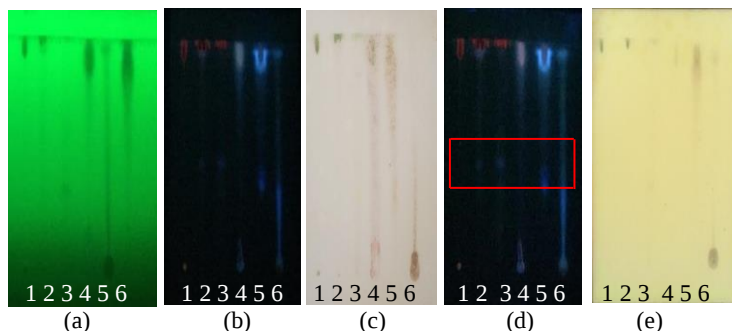
masing-masing tingkat kepolaran. Pengamatan dilakukan dibawah lampu uv 254nm, uv 365nm, dengan penampak bercak H_2SO_4 visual, sinar UV 365 nm sitroborat, sinar UV 365 nm AlCl_3 , dan FeCl_3 visual.



Gambar VI.1 Kromatogram ekstrak, dengan fase diam silika gel F_{254} pengembang non polar. n-Heksana-etil asetat (7:3). Ekstrak n-Heksana daun (1), etil asetat daun (2), etanol daun (3), N-hexana batang (4), etil asetat batang (5), etanol batang (6). UV λ 254 nm (a), UV λ 365 nm (b), penampak bercak H_2SO_4 10% (c), penampak bercak sitroborat 10% (d), penampak bercak FeCl_3 10% (e).



Gambar VI.2 Kromatogram ekstrak, dengan fase diam silika gel F_{254} pengembang semi polar. Kloroform-etil asetat (10:1). Ekstrak n-Heksana daun (1), etil asetat daun (2), etanol daun (3), n-Heksana batang (4), etil asetat batang (5), etanol batang (6). UV λ 254 nm (a), UV λ 365 nm (b), penampak bercak H_2SO_4 10% (c), penampak bercak sitroborat 10% (d), penampak bercak FeCl_3 10% (e).



Gambar VI.3 Kromatogram ekstrak, dengan fase diam silika gel F_{254} pengembang polar. Etil asetat-asam format-air (8:1:1). Ekstrak n-Heksana daun (1), etil asetat daun (2), etanol daun (3), n-Heksana batang (4), etil asetat batang (5), etanol batang (6). UV λ 254 nm (a), UV λ 365 nm (b), penampak bercak H_2SO_4 10% (c), penampak bercak sitroborat 10% (d), penampak bercak $FeCl_3$ 10% (e).

Pemantauan kualitatif ini menggunakan penampak bercak bertujuan mengetahui golongan senyawa yang diketahui memiliki aktivitas antidiabetes pada setiap ekstrak yang diuji. Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan penampak bercak sitroborat. Hasilnya menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid, ditandai dengan adanya bercak berfluoresensi kuning kehijauan. Untuk senyawa golongan fenol menggunakan penampak bercak $FeCl_3$ 10%, menunjukkan bercak berwarna hijau kehitaman. Pada penyemprotan menggunakan H_2SO_4 10% sebagai penampak bercak universal, timbul warna kuning, hijau, dan ungu kehijauan setelah plat silika dipanaskan beberapa menit.

VI.7 Pengujian Aktivitas Penghambatan Alfa Glukosidase

Pengujian aktivitas penghambatan α -glukosidase bertujuan untuk mengetahui aktivitas penghambatan α -glukosidase oleh ekstrak daun dan batang paliasa menggunakan akarbose sebagai standar. Akarbose dan ekstrak akan menghambat hidrolisis substrat *p*NPG oleh enzim α -glukosidase. Hidrolisis substrat oleh enzim menghasilkan *p*-Nitrofenol yang berwarna kuning (Sugiwati, dkk., 2009). Sehingga semakin baik daya hambat oleh ekstrak, maka intensitas warna kuning yang terbentuk pada larutan uji akan semakin berkurang, sehingga menyebabkan semakin kecilnya nilai absorbansi pada larutan uji.

VI.7.1 Optimasi Konsentrasi Enzim

Sebelum melakukan pengujian terhadap sampel, dilakukan uji pendahuluan untuk mengetahui kondisi optimal kerja enzim. α -glukosidase yang digunakan berasal dari *Saccharomyces cereviceae*. Adanya data mengenai pH optimum dan suhu stabilitas enzim memudahkan peneliti karena tidak perlu melakukan optimasi dalam hal pH dan suhu.

Uji pendahuluan dilakukan sebelum uji penghambatan aktivitas α -glukosidase. Konsentrasi substrat perlu dioptimasi untuk mengetahui pada konsentrasi berapa semua sisi aktif enzim terikat oleh substrat dan tidak lagi akan menghasilkan produk. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan natrium karbonat karena pada suasana basa reaksi enzimatik akan terhenti. Konsentrasi substrat yang digunakan adalah 15 mM. Optimasi konsentrasi enzim dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi yang optimal. Optimasi dilakukan pada

konsentrasi enzim 0,2U/ml; 0,3U/ml; 0,4U/ml; 0,5U/ml; 0,6U/ml; 0,7U/ml; 0,8U/ml.

Tabel VI.3 Hasil Optimasi Konsentrasi Enzim

Konsentrasi (U/ml)	Absorbansi	Absorbansi Uji - Absorbansi Blanko
0,2	0,271	0,206
0,3	0,646	0,581
0,4	0,8621	0,797
0,5	1,673	1,608
0,6	1,968	1,903
0,7	2,212	2,147
0,8	3,755	3,69
Blanko	0,065	

Berdasarkan hasil optimasi enzim menunjukkan konsentrasi optimum dari enzim adalah 0,4U/ml, ditandai dengan nilai serapan sebesar 0,797.

VI.7.2 Uji Penghambatan Aktivitas Alfa glukosidase

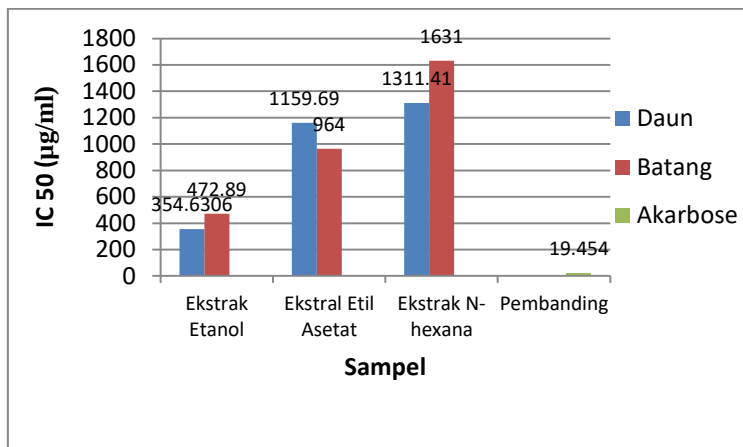
Penghambatan aktivitas enzim dilakukan dengan membandingkan nilai absorbansi sampel (S) dengan blanko (B). Larutan sampel (S) diinkubasi selama 15menit bersama dengan dapar fosfat pH 6,8, enzim alfa glukosidase 0,4U/ml, dan sampel. Setelah itu, campuran direaksikan dengan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida 15mM dan diinkubasi kembali selama 15 menit. Kemudian ditambahkan natrium karbonat untuk menghentikan reaksi enzimatik tersebut. Untuk blanko sampel (BS), pengamatan dilakukan sama tetapi tanpa enzim alfa glukosidase. Blanko sampel dilakukan untuk mengetahui apakah ada senyawa lain yang memberikan absorbansi pada panjang

gelombang 405 nm. Larutan Kontrol (K) adalah larutan uji tanpa sampel dengan perlakuan yang sama. Blanko kontrol (BK) dilakukan hanya larutan dapar fosfat pH 6,8.

Proses inkubasi terdiri dari dua tahap. Tahap pertama, inkubasi selama 15 menit bertujuan untuk memberikan waktu bagi larutan uji untuk mencapai suhu 37°C. Sedangkan pada tahap kedua bertujuan untuk reaksi enzimatik. Unit enzim yang digunakan dalam uji adalah 0,4U/ml.

Sebagai pembanding, digunakan akarbose, dimana senyawa ini telah teruji mampu menghambat aktivitas α -glukosidase. Dipilih pembanding akarbose karena akarbose merupakan obat yang sudah biasa digunakan dalam pengobatan klinis. Selain itu, untuk pengujian penghambatan aktivitas α -glukosidase umumnya digunakan akarbose. Pada saat reaksi enzimatik, akarbose menghambat substrat secara kompetitif.

Ekstrak kental n-Heksana, etil asetat, etanol daun dan batang masing-masing diuji penghambatan aktivitas α -glukosidase dan diperoleh data sebagai berikut.



Hasil pengujian sampel menunjukkan bahwa nilai IC_{50} paling kecil adalah ekstrak etanol daun nilai IC_{50} 354,63 µg/ml. dan ekstrak etanol batang nilai IC_{50} 472,89 µg/ml. Standar atau pembanding berupa akarbose yaitu 19,454 µg/ml. Menurut Lee dan Lee (2001), suatu senyawa dikatakan tergolong tidak aktif sebagai antidiabetes jika memiliki nilai IC_{50} sebesar > 100 µg/ml. tergolong aktif jika memiliki nilai IC_{50} sebesar 100-11 µg/ml. dan tergolong sangat aktif jika memiliki IC_{50} sebesar <11 µg/ml. berdasarkan sampel yang telah diuji dapat disimpulkan bahwa sampel tidak memiliki aktivitas terhadap penghambatan α -glukosidase.