

Bab VI Hasil dan Pembahasan

VI.1. Penyiapan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian rimpang dari tanaman bangle hitam yang telah dideterminasi untuk membuktikan kebenaran identitasnya. Hasil dari determinasi (Lampiran 2) menyatakan bahwa tanaman yang digunakan adalah benar *Zingiber ottensii*.

VI.2. Pengolahan Bahan Menjadi Simplisia

VI.2.1. Sortasi Basah

Sortasi basah dilakukan untuk memilah dan memilih rimpang bangle hitam yang masih segar. Sementara bagian rimpang yang sudah rusak dan busuk dipisahkan beserta dengan pengotor lainnya seperti tanah, batu dan kerikil. Tujuan dari proses ini adalah mendapatkan rimpang bangle hitam dengan kualitas yang baik.

VI.2.2. Pencucian

Rimpang bangle hitam yang terpilih dicuci menggunakan air bersih yang mengalir. Tahap pencucian ini bertujuan untuk membersihkan rimpang bangle hitam dari sisa-sisa kotoran yang masih menempel.

VI.2.3. Pengubahan Bentuk

Rimpang bangle hitam dirajang untuk merubah bentuknya sehingga diperoleh irisan tipis. Tujuannya adalah untuk memperkecil ukuran partikel rimpang bangle hitam agar dapat memudahkan proses dari tahapan selanjutnya.

VI.2.4. Pengeringan

Pengeringan bertujuan untuk mendapatkan simplisia rimpang bangle hitam yang tidak mudah rusak sehingga aman bila disimpan dalam jangka waktu yang cukup lama.

VI.2.5. Sortasi Kering

Sortasi kering dilakukan untuk memisahkan simplisia rimpang bangle hitam dari bagian-bagian yang rusak karena pemanasan beserta dengan pengotor lain yang tidak diinginkan.

VI.2.6. Penghalusan

Simplisia rimpang bangle hitam dihaluskan untuk memperkecil ukuran partikelnya dengan cara ditumbuk untuk memudahkan proses ekstraksi. Ukuran partikel yang diperkecil, akan memperbesar luas permukaan bahan yang kontak dengan pelarut, sehingga dapat memudahkan proses pengeluaran senyawa aktif yang terkandung di dalamnya.

VI.2.7. Penyimpanan

Penyimpanan dilakukan di dalam wadah yang tertutup rapat, kering dan terhindar dari cahaya. Hal ini dilakukan untuk menjaga agar simplisia tetap berada dalam keadaan yang baik.

VI.3. Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi simplisia digunakan sebagai salah satu parameter standardisasi yang bertujuan untuk mengetahui kualitas dan mutu simplisia yang digunakan pada penelitian ini. Karakterisasi simplisia yang dilakukan meliputi pemeriksaan organoleptik dan makroskopik,

penetapan kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol dan susut pengeringan.

Pemeriksaan organoleptik dan makroskopik dilakukan terhadap rimpang bangle hitam yang segar dan juga terhadap bentuk simplisianya. Pemeriksaan ini merupakan tahap pengenalan awal secara subjektif yang bertujuan untuk memberikan identitas pada bahan yang digunakan. Untuk hasil pengamatan organoleptik dan makroskopik rimpang bangle hitam dapat dilihat pada **Gambar VI.1** dan **Tabel VI.1** di bawah ini.



Gambar VI.1: Rimpang bangle hitam secara makroskopis (a) rimpang segar; (b) rimpang kering

Tabel VI.1
Pengamatan Organoleptik dan Makroskopik Rimpang Segar Bangle Hitam

Pengamatan	Rimpang Segar	Rimpang Kering
Bentuk	Hampir lonjong tidak beraturan	Hampir lonjong dan kering
Ukuran	Panjang 16,5 cm Lebar 2,5 cm	Panjang 2,5 cm Lebar 2 cm
Warna	Bagian luar coklat bagian dalam ungu kehitaman	Ungu
Bau	Khas	Khas

Hasil karakterisasi untuk penetapan kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol dan susut pengeringan dapat dilihat pada **Tabel VI.2** di bawah ini.

Tabel VI.2
Hasil Karakterisasi Simplisia

Penetapan	Hasil Pengamatan (%)
kadar abu total	6,60
kadar abu tidak larut asam	2,32
kadar sari larut air	10,75
kadar sari larut etanol	8,73
susut pengeringan	9,85

Penetapan kadar abu total menunjukkan nilai sebesar 6,60%. Penetapan ini bertujuan untuk memberikan gambaran mengenai jumlah kandungan mineral internal dan eksternal dari simplisia yang digunakan. Sementara hasil penetapan kadar abu tidak larut asam menunjukkan nilai sebesar 2,32 %. Tujuan penetapan kadar abu tidak larut asam adalah untuk mengetahui gambaran dari kandungan mineral eksternal, senyawa anorganik dan pengotor dalam simplisia. Penetapan kadar sari larut air menunjukkan hasil sebesar 10,75 %. Nilai ini lebih besar jika dibandingkan dengan penetapan kadar sari larut etanol yang hasilnya adalah 8,73 %. Penetapan kadar sari memiliki tujuan untuk mengetahui jumlah kandungan senyawa di dalam simplisia yang dapat tersari oleh pelarut tertentu. Sehingga berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa senyawa dalam simplisia rimpang bangle hitam ini tersari lebih banyak oleh pelarut air dibandingkan etanol.

Hasil dari penetapan susut pengeringan simplisia rimpang bangle hitam menunjukkan nilai sebesar 9,85 %. Penetapan ini dilakukan untuk mengetahui adanya komponen lain yang menguap selain air pada proses penguapan dengan suhu 105⁰C.

VI.4. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan sebagai metode analisa kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui keberadaan golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam simplisia rimpang bangle hitam. Penapisan fitokimia ini dilakukan untuk golongan senyawa Alkaloid, Saponin, Tanin dan Polifenol, Flavonoid, Kuinon dan Steroid/Triterpenoid.

Hasil penapisan fitokimia berdasarkan **Tabel VI.3** menunjukkan bahwa simplisia rimpang bangle hitam mengandung golongan senyawa saponin, flavonoid dan steroid. Hasil penelitian ini hampir menunjukkan kesamaan dengan hasil penelitian Sulaeman, *et al.*, (2018) yang menyebutkan bahwa simplisia rimpang bangle hitam mengandung senyawa saponin, flavonoid dan triterpenoid. Perbedaan ini tidak terlalu signifikan karena steroid dan triterpenoid masih termasuk kedalam satu golongan senyawa steroid alam. Adapun perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah faktor lingkungan.

Tabel VI.3
Hasil Penapisan Fitokimia Simplisia

No	Golongan Senyawa	Hasil Pengamatan
1	Alkaloid	–
2	Saponin	+
3	Tanin dan Polifenol	–
4	Flavonoid	+
5	Kuinon	–
6	Steroid/Triterpenoid	+

Keterangan:

+ : mengandung senyawa yang diuji

– : tidak mengandung senyawa yang diuji

Hasil dari identifikasi saponin menunjukkan keberadaan buih yang timbul setelah pengocokan. Buih tersebut merupakan glikosida yang mengalami hidrolisis membentuk glukosa dan senyawa lainnya yang akan tetap stabil setelah penambahan HCl (Marliana, 2005; Farnsworth, 1966).

Hasil positif yang ditunjukkan oleh golongan senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuknya garam flavilium yang berwarna merah-jingga pada lapisan amil alkohol. Kehadiran garam flavilium ini merupakan hasil reduksi cincin benzopiron oleh suatu kompleks yang terbentuk antara logam Mg dan HCl (Robinson, 1995).

Golongan senyawa steroid dinyatakan positif terkandung di dalam simplisia rimpang bangle hitam. Hasil ini ditandai dengan adanya kompleks berwarna hijau (Farnsworth, 1966).

VI.5. Ekstraksi

Sebanyak 3,5 Kg serbuk simplisia rimpang bangle hitam diekstraksi dengan metode maserasi selama tiga kali 24 jam. Metode ini merupakan metode ekstraksi cara dingin yang dipilih karena dianggap sebagai metode paling aman dan sederhana. Sebab, sifat dari senyawa aktif pada tanaman yang memiliki aktivitas sebagai penghambat kerja enzim alfa-glukosidase belum diketahui secara pasti.

Etanol 70% merupakan pelarut yang digunakan untuk merendam simplisia selama proses ekstraksi. Pelarut ini menurut Wijesekera (1991) merupakan pelarut universal terbaik yang dapat menarik sebagian besar senyawa bahan alam. Alasan inilah yang mendasari pemilihan etanol 70% sebagai pelarut dalam ekstraksi agar dapat menarik senyawa aktif yang belum diketahui sifatnya pada simplisia rimpang bangle hitam.

Filtrat dari proses ekstraksi dipekatkan menggunakan *rotary vaporator*. Alat ini mampu menguapkan pelarut dibawah titik didihnya. Dari proses penguapan ini kemudian didapatkan ekstrak kental dengan bobot sebesar 269,03 gram dengan nilai rendemen ekstrak sebesar 7,687% .

VI.6. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan metode Ekstraksi Cair-Cair (ECC) untuk memisahkan komponen senyawa dalam ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya. Hasil dari proses fraksinasi ekstrak rimpang bangle hitam ini dapat dilihat pada **Tabel VI.4** berikut.

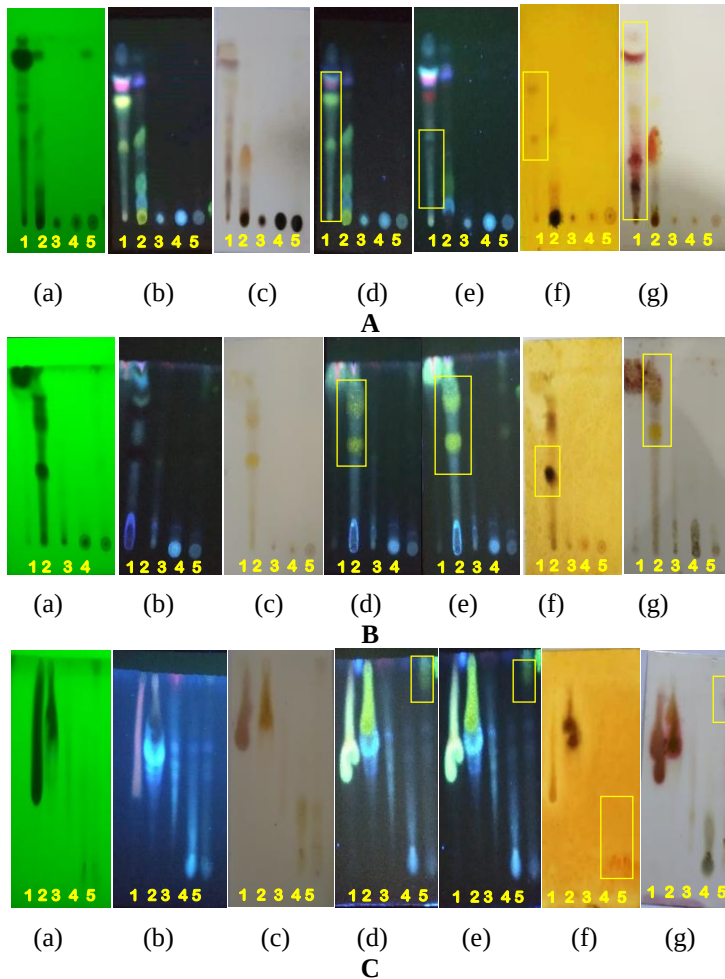
Tabel VI.4
Hasil Fraksinasi Ekstrak Rimpang Bangle Hitam

Fraksi	Bobot Kental (g)	Rendemen (%)
n-Heksan	5,89	2,80
Etil Asetat	4,3907	2,09
Butanol	67,1809	31,99
Air (Sisa)	131,9344	62,83

Berdasarkan tabel di atas, nilai rendemen paling besar ditunjukkan oleh fraksi air sehingga dapat diketahui bahwa senyawa bahan alam yang terdapat dalam rimpang bangle hitam lebih banyak yang bersifat polar karena terdistribusi lebih banyak pada pelarut air.

VI.7. Pemantauan Ekstrak dan Fraksi

Pemantauan ekstrak dan fraksi dilakukan untuk memastikan keberadaan kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak dan fraksi simplisia rimpang bangle hitam. Pemantauan dilakukan dengan metode KLT dan beberapa pengembang dengan kepolaran yang berbeda. Penampak bercak yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan golongan senyawa kimia antara lain H_2SO_4 10% dalam methanol, berperan sebagai penampak bercak universal yang dapat mendeteksi hampir semua senyawa metabolit sekunder bahan alam; AlCl_3 5% dalam metanol dan Sitroborat digunakan untuk mendeteksi keberadaan senyawa flavonoid; Anisaldehyd untuk mendeteksi senyawa steroid bahan alam dan FeCl_3 10% untuk mengetahui keberadaan senyawa fenolat. Hasil pemantauan ekstrak dan fraksi dengan menggunakan metode KLT dapat dilihat pada **Gambar VI.2** di bawah ini.



Gambar.VI.2: Kromatogram ekstrak dan fraksi rimpang bangle hitam, fase diam silika gel F₂₅₄, pengembang **A** n-heksan:etil asetat (7:3), **B** kloroform:metanol (8:2), **C** butanol:asam asetat:air (4:1:5). (1) fraksi n-heksan; (2) fraksi etil asetat; (3) fraksi butanol; (4) fraksi air; (5) ekstrak. (a) sinar UV 254 nm; (b) sinar UV 365 nm; (c) penampak bercak H₂SO₄ 10% dalam metanol; (d) penampak bercak AlCl₃ 5% dalam

metanol; (e) penampak bercak sitroborat; (f) penampak bercak FeCl_3 10%; (g) penampak bercak anisaldehyd.

Berdasarkan hasil pemantauan ekstrak dan fraksi rimpang bangle hitam dengan menggunakan KLT diketahui adanya bercak berwarna kuning pada plat yang telah disemprot dengan penampak bercak AlCl_3 10% dalam metanol dan sitroborat. Hal ini menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid pada fraksi n-heksan dan etil hampir pada semua pengembangan. Plat yang disemprot dengan penampak bercak FeCl_3 10% juga menunjukkan adanya golongan senyawa fenolat bahan alam pada sampel. Hal ini diketahui dari bercak hitam pada plat yang digunakan. Plat yang telah disemprot dengan penampak bercak Anisaldehyd menunjukkan adanya bercak berwarna ungu dan orange yang menunjukkan keberadaan senyawa golongan steroid bahan alam.

VI.8. Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Alfa-glukosidase

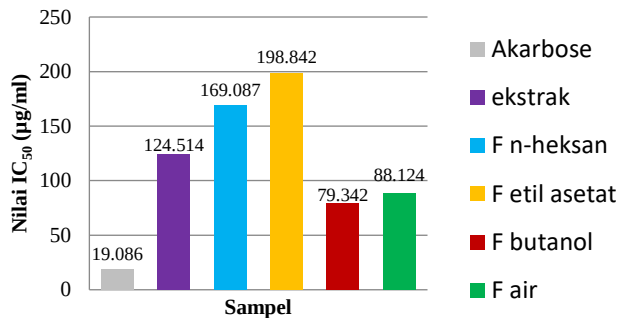
VI.8.1. Optimasi Konsentrasi Enzim

Optimasi konsentrasi enzim ini dilakukan sebagai uji pendahuluan untuk mengetahui konsentrasi optimum enzim alfa-glukosidase yang digunakan dalam pengujian. Variasi konsentrasi enzim yang digunakan dalam uji pendahuluan ini adalah 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 dan 0,8 U/mL dengan konsentrasi substrat pNPG adalah 15 mM. Konsentrasi enzim yang menunjukkan absorbansi tertinggi memberikan informasi bahwa semakin banyak produk yang dihasilkan dari reaksi enzimatis antara enzim alfa-glukosidase dan substrat pNPG. Absorbansi yang baik menurut *Lambert-Beer* berada pada rentang 0,2 – 0,8. Oleh karena itu, berdasarkan hasil

pengamatan (Lampiran 3) konsentrasi enzim yang optimum berada pada konsentrasi 0,4 U/mL dengan nilai absorbansi sebesar 0,862.

VI.8.2. Pengujian Ekstrak dan Fraksi Rimpang Bangle Hitam

Uji penghambatan aktivitas enzim alfa-glukosidase pada penelitian ini dilakukan pada sampel ekstrak, fraksi n-heksan, etil asetat, butanol dan air dari simplisia rimpang bangle hitam. Konsentrasi sampel yang digunakan masing-masing dibuat bervariasi, hal ini tujuan untuk mengetahui persen inhibisi dari masing-masing konsentrasi tersebut, dimana data persen inhibisi ini akan digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} yang pada akhirnya akan menunjukkan kekuatan penghambatan terhadap enzim alfa-glukosidase. Sampel yang memiliki nilai IC_{50} terendah adalah sampel yang memiliki kekuatan penghambatan enzim paling tinggi. Hasil pengujian aktivitas penghambatan enzim alfa-glukosidase dari beberapa sampel dan perbandingan dapat dilihat pada **Gambar VI.3**.



Gambar VI.3 : Perbandingan nilai IC_{50} Akarbose, Ekstrak, dan Fraksi-fraksi simplisia rimpang bangle hitam.

Gambar di atas menunjukkan bahwa Fraksi Butanol memiliki kekuatan penghambatan terbesar dibandingkan sampel lainnya

dengan nilai IC_{50} sebesar 79,342 $\mu\text{g/mL}$ diikuti oleh Fraksi Air dengan nilai IC_{50} 88,124 $\mu\text{g/mL}$. Kedua fraksi tersebut menurut Dewiyanti, *et al.*, (2012) dapat berpotensi sebagai agen penghambat kerja enzim alfa-glukosidase karena nilai IC_{50} yang ditunjukkan berada dibawah 100 ppm atau $\mu\text{g/mL}$.

Senyawa aktif yang berpotensi sebagai agen penghambat kerja enzim alfa-glukosidase pada fraksi butanol dan air kemungkinan bersifat polar karena kedua fraksi tersebut juga bersifat polar. Hal ini sesuai dengan prinsip kelarutan *like dissolve like*, dimana senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar dan begitupun sebaliknya. Namun belum dapat dipastikan jenis senyawa apa yang bertanggung jawab terhadap penghambatan aktivitas enzim alfa glukosidase tersebut.

Kekuatan ekstrak dan fraksi simplisia rimpang bangle hitam dalam menghambat aktivitas kerja enzim alfa-glukosidase ini dibandingkan terhadap akarbose. Nilai IC_{50} akarbose dari hasil pengujian adalah sebesar 19,086 $\mu\text{g/mL}$. Nilai ini jauh lebih rendah, sehingga aktivitas penghambatannyapun akan jauh lebih tinggi dibandingkan dengan sampel ekstrak dan fraksi simplisia rimpang bangle hitam yang digunakan.