

BAB VI Hasil Penelitian dan Pembahasan

VI.1 Penyiapan Bahan

Penyiapan bahan meliputi pengambilan bahan, determinasi, dan pembuatan simplisia, dimulai dari sortasi basah hingga penyimpanan simplisia. Bahan tumbuhan diperoleh dari Kampung Sukasari, Banjaran, Kabupaten Bandung.

Hasil determinasi dilakukan di Laboratorium Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Departemen Bidang Sumber Daya, Institut Teknologi Bandung dan diperoleh informasi bahwa tumbuhan tersebut merupakan tumbuhan kupa dengan nama latin *Syzygium polycephalum* (Miq.) Merr. & L. M. Perry. Termasuk famili Myrtaceae.

Proses pembuatan simplisia daun kupa diawali dengan sortasi basah atau memisahkan daun yang bagus dan utuh dengan daun yang sudah rusak atau sudah tidak layak. Kemudian dilanjutkan dengan mencuci daun pada air mengalir lalu dilakukan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 2 hari sampai daun kering yang ditandai dengan daun mudah hancur dengan cara diremas. Tahap selanjutnya adalah melakukan perubahan bentuk pada daun agar menjadi serbuk dengan cara menggiling menggunakan blender. Serbuk simplisia daun kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari cahaya.

VI.2 Karakterisasi simplisia

Karakterisasi simplisia bertujuan untuk memastikan suatu simplisia memenuhi syarat mutu, dalam artian memenuhi syarat standar (kimia, biologi, dan farmasi), termasuk batasan stabilitas sebagai produk kefarmasian pada umumnya. Karakterisasi terhadap serbuk simplisia daun kupa meliputi pengujian makroskopik, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, penetapan kadar air, dan penetapan susut pengeringan.

Pengujian makroskopik meliputi pemeriksaan bentuk, warna, ukuran dan aroma pada daun menggunakan panca indra.



Gambar VI.1 Makroskopik Daun Kupa. (Sumber : koleksi pribadi)

Hasil pengamatan makroskopik dari daun kupa yaitu bentuk daun yang berbentuk lonjong dengan ukuran 20-25 cm. Daun berwarna hijau tua mengkilap, dengan 12-14 urat lateral pada kedua sisi dari tulang daun.

Penetapan kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya simplisia. Kandungan kadar abu total yang besar menandakan simplisia daun kupa mengandung mineral. Kadar abu tidak larut asam memberikan gambaran kandungan mineral dan senyawa anorganik dalam simplisia yang kemungkinan berasal dari lingkungan seperti debu dan tanah yang masih melekat pada bagian tanaman dan terbawa sampai pada proses pembuatan simplisia. Adapun partikel yang kemungkinan ada dan tidak mudah hilang pada proses pengabuan adalah logam berat. Kandungan mineral internal dan eksternal simplisia daun kupa sebesar 6,08 % b/b, sedangkan kandungan mineral eksternalnya adalah sebesar 0,86 % b/b.

Tabel VI.1
Hasil Karakterisasi Simplisia Daun Kupa

Pemeriksaan	Hasil % b/b
	Daun
Kadar abu total	6,08
Kadar Abu Tidak larut asam	0,86
Kadar sari larut etanol	14,96
Kadar sari larut air	16,41
Susut pengeringan	8,48

Penetapan kadar sari bertujuan untuk memberikan gambaran awal jumlah kandungan senyawa yang tersari pada pelarut tertentu. Berdasarkan hasil yang diperoleh, terlihat bahwa senyawa dalam simplisia daun kupa lebih banyak terlarut dalam pelarut air, yaitu sebesar 16,41 % b/b, sedangkan dalam etanol sebesar 14,96 % b/b, karena menunjukkan bahwa jumlah zat yang tertarik dalam pelarut air lebih banyak.

Pemeriksaan susut pengeringan bertujuan untuk melihat banyaknya senyawa dalam simplisia yang menguap pada suhu 105°C. Hasil yang didapat menunjukkan susut pengeringan pada daun kupa yaitu 8,48 %.

VI.3 Penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam simplisia daun kupa. Penapisan fitokimia yang dilakukan terdiri dari pemeriksaan golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, dan steroid/ triterpenoid.

Tabel VI.2
Hasil Penapisan Fitokimia

Pemeriksaan		Hasil
Alkaloid		-
Flavanoid		+
Kuinson		+
Saponin		+
Tanin	• Tanin (FeCl ₃)	+
	• Tanin (Gelatin)	+
	• Tanin (Stiasny)	+
Steroid/Triterpenoid		+

Keterangan : + : mengandung golongan senyawa yang diuji.

- : tidak mengandung golongan senyawa yang diuji.

Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa simplisia daun kupa mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin, kuinon, dan steroid/ triterpenoid.

VI.4 Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi simplisia daun kupa dilakukan dengan metode refluks menggunakan pelarut etanol 96%. Metode refluks dipilih karena dapat memberikan rendemen ekstrak yang lebih banyak disebabkan adanya bantuan pemanasan. Pelarut etanol dipilih karena bersifat universal sehingga dapat menarik hampir semua senyawa bahan alam.

Simplisia daun kupa di timbang sebanyak 500 g dengan volume pelarut etanol 96% sebanyak 5 L (1:10). Ekstraksi dilakukan untuk masing-masing 125 g simplisia dengan 1250 mL pelarut, selama 3 jam dengan 3 kali pengulangan, bertujuan untuk mendapatkan ekstrak yang lebih banyak. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vaporator* hingga menjadi ekstrak kental. Hasil Ekstrak kental etanol sebanyak 92,212 g dengan rendemen yaitu 18,44%.

Selanjutnya dilakukan fraksinasi terhadap ekstrak etanol dengan pelarut n-heksana dan etil asetat, menggunakan cara ekstraksi cair-cair (ECC). Ekstrak yang ditimbang sebanyak 25 g dengan volume pelarut 250 mL. Ekstrak etanol dilarutkan dalam pelarut etanol 20% sebanyak 250 mL. Larutan ekstrak kemudian di masukkan kedalam corong pisah dan fraksinasi dengan pelarut n-Heksana (1:1), dan dikocok, kemudian difraksinasi kembali menggunakan pelarut etil asetat dengan prinsip pengerjaan yang sama. Masing-masing fraksinasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dan dilakukan sebanyak 2 batch. fraksi n-Heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi

etanol-air 20% kemudian di pekatkan menggunakan *rotary vaporator* hingga menjadi fraksi kental.

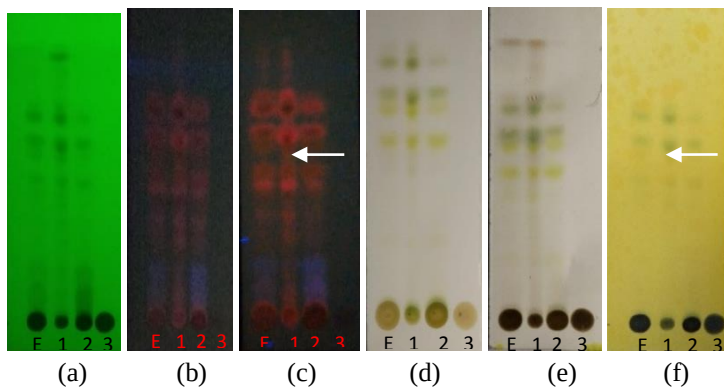
Tabel VI.3
Hasil Rendemen Fraksi

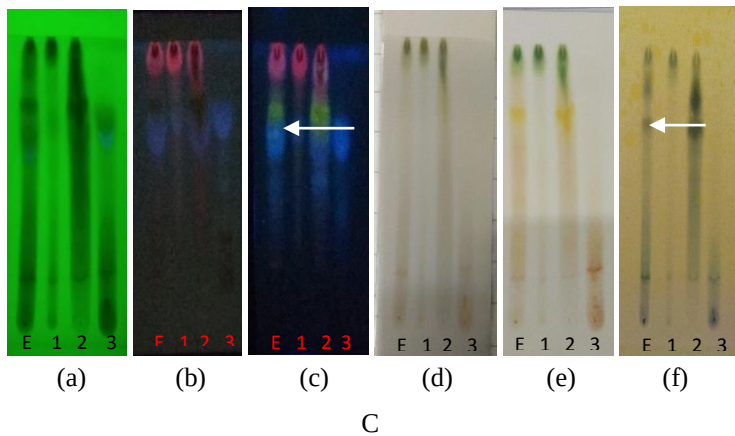
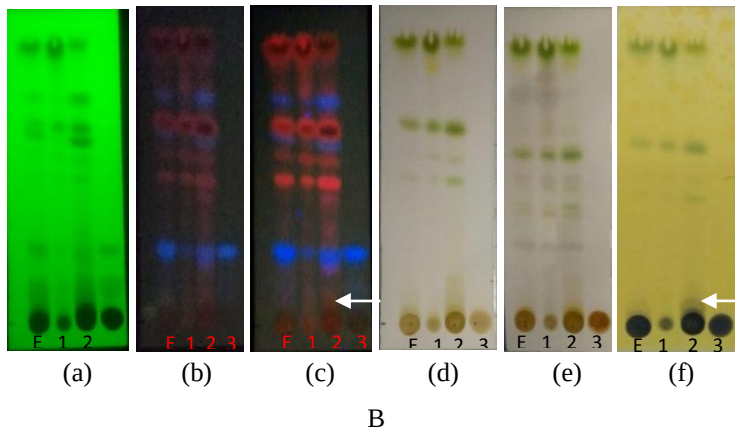
Fraksi	Fraksi kental (g)	Rendemen (%)
n-Heksana	5,44	10,88
Etil Asetat	7,31	14,62
Etanol-Air 20%	19,8	39,6

$$\text{Keterangan : \% rendemen} = \frac{\text{ekstrak kental}}{\text{jumlah simplisia}} \times 100$$

VI.5 Pemantauan Ekstrak dan Fraksi

Pemantauan ekstrak dan fraksi dilakukan dengan KLT menggunakan plat silika gel F₂₅₄. Hasil pemantauan terhadap ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air 20% dengan pengembang n-heksana-etil asetat (7:3), kloroform-metanol (9:1), dan BAW (4:1:5).





Gambar VI.2 Kromatogram Lapis Tipis Ekstrak, dengan fase diam silika gel F_{254} dan pengembang n-Heksana-etil asetat 7:3 (A), kloroform-metanol 9:1 (B), BAW 4:1:5 (C), ekstrak etanol (E), fraksi n-heksana (1), fraksi etil asetat (2), fraksi etanol-air 20% (3), sinar UV λ 254 nm (a), sinar UV λ 365 nm (b), penampak bercak AlCl_3 5% di bawah sinar UV λ 365 nm (c), sinar tampak (d), penampak bercak H_2SO_4 10% (e), penampak bercak FeCl_3 10% (f).

Berdasarkan hasil pemantauan ekstrak dan fraksi yang disemprot dengan beberapa macam penampak bercak diantaranya penampak bercak H_2SO_4 10% sebagai penampak bercak universal untuk melihat semua senyawa yang ada secara visual pada plat KLT. Kemudian terdapat bercak yang berfluoresensi berwarna hijau kekuningan, biru di bawah sinar lampu UV 365 nm setelah di semprotkan penampak bercak AlCl_3 5% yang menandakan adanya golongan senyawa flavonoid. Terdapat pula spot berwarna hitam dengan latar kuning yang tampak setelah di semprotkan penampak bercak FeCl_3 10% yang menandakan adanya senyawa fenol.

VI.6 Uji Aktivitas Inhibisi Enzim xantin oksidase

Uji aktivitas dilakukan untuk mengetahui aktivitas penghambatan ekstrak dan fraksi daun kupa terhadap xantin oksidase dari berbagai konsentrasi ekstrak dan fraksi dengan melihat nilai persen inhibisi. Selain itu juga untuk mengetahui kekuatan penghambatan ekstrak dan fraksi tersebut terhadap enzim dengan melihat nilai IC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim.

Prinsip pengukuran uji penghambatan aktivitas xantin oksidase adalah mengukur jumlah asam urat yang terbentuk pada reaksi yang dikatalisis oleh xantin oksidase. Uji Aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol-air 20% daun kupa dilihat dari penurunan konsentrasi asam urat yang terbentuk. Pengujian ini merupakan

model pengujian secara *in vitro* yang dilakukan dengan alat spektrofotometer.

Dalam pengujian aktivitas inhibisi xantin oksidase digunakan juga obat pembanding sebagai kontrol positif, yang sudah diketahui dapat menurunkan kadar asam urat. Allopurinol merupakan obat yang sering digunakan dalam penelitian inhibisi xantin oksidase dimana biasanya digunakan sebagai kontrol positif dengan mekanisme menghambat kerja enzim xantin oksidase.

VI.6.1 Pengujian Standar dan Sampel

Larutan induk standar dibuat dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$, lalu diencerkan menjadi 50 $\mu\text{g/mL}$, kemudian dibuat dalam seri konsentrasi 1-5 $\mu\text{g/mL}$ untuk allopurinol.

Larutan induk sampel dibuat dengan konsentrasi 400 $\mu\text{g/mL}$, kemudian dibuat dalam seri konsentrasi berdasarkan hasil orientasi konsentrasi sampel. Larutan induk diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi 20-140 $\mu\text{g/mL}$ untuk ekstrak etanol, 50-350 $\mu\text{g/mL}$ untuk fraksi n-Heksana, 10-120 $\mu\text{g/mL}$ untuk fraksi etil asetat, 10-140 $\mu\text{g/mL}$ untuk fraksi etanol-air 20%.

Jumlah seri konsentrasi yang dibuat disesuaikan dengan sampel yang diukur dan dilakukan 3 kali pengulangan untuk masing-masing konsentrasi. Pengujian ini dilakukan pada beberapa konsentrasi sampel yang bervariasi bertujuan untuk mengetahui pengaruh

penambahan konsentrasi sampel terhadap aktivitas penghambatan dan untuk memperoleh nilai % inhibisi.

Semakin besar konsentrasi sampel, semakin besar pula penghambatan aktivitas enzim. Sehingga jumlah produk (asam urat) yang dihasilkan berkurang. Nilai % inhibisi selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} yang dapat menunjukkan kekuatan penghambatan sampel terhadap enzim.

Pembuatan seri konsentrasi yang meningkat didasarkan pada penggunaan metode regresi dalam membuat persamaan garis yang didasarkan pada nilai absorbansi dan konsentrasi yang dibuat meningkat agar dapat memberikan serapan yang linear. Parameter yang digunakan untuk pengukuran aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase adalah nilai IC_{50} yaitu bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak atau fraksi yang mampu menghambat aktivitas enzim xantin oksidase sebesar 50%.

Pada pengujian ini, dilakukan pengukuran terhadap absorbansi larutan sampel dan absorbansi kontrol. Larutan sampel mengandung sampel, enzim, substrat, dan HCl, sedangkan pada kontrol digunakan dapar fosfat pH 7,5 sebagai pengganti sampel.

Untuk setiap pengujian sampel uji, standar dan kontrol, selalu dilakukan pembacaan absorbansi blanko. Hal ini dilakukan untuk melihat apakah masih dapat terbentuk produk tanpa adanya enzim,

dan juga sebagai faktor koreksi apabila sampel itu sendiri memiliki serapan pada panjang gelombang 290 nm.

Hasil pengujian aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase terhadap ekstrak dan fraksi daun kupa dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel VI.4
Nilai IC₅₀ Ekstrak, Fraksi Daun Kupa dan Pembanding

Sampel	Nilai IC ₅₀ (µg/ml)
Ekstrak Etanol	77,67 ± 0,077
Fraksi n-Heksana	241,06 ± 0,898
Fraksi Etil Asetat	41,21 ± 0,2
Fraksi etanol-air 20%	62,98 ± 0,169
Allopurinol	2,85 ± 0,009

Semakin kecil nilai IC₅₀ artinya semakin besar daya penghambatan terhadap enzim xantin oksidase. Dari keempat sampel tersebut, sampel dikatakan aktif apabila nilai IC₅₀ sampel lebih kecil dari nilai IC₅₀ pembanding (allopurinol). Dari hasil penelitian nilai IC₅₀ allopurinol sebesar 2,85 µg/mL. Hasil uji menunjukkan bahwa dari keempat sampel tersebut tidak ada yang memiliki aktivitas penghambatan enzim yang lebih kuat dari allopurinol.