



TESIS

PEMISAHAN DAN IDENTIFIKASI ANTIOKSIDAN DAN INHIBITOR α -GLUKOSIDASE DARI DAUN SALAM

MUTIA DEVI HIDAYATI
NRP. 1412 201025

Dosen Pembimbing
SRI FATMAWATI, M.Sc., Ph.D
Prof. Dr. TASILIM ERSAM

PROGRAM MAGISTER
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2015



THESES-SK 142502

SEPARATION AND IDENTIFICATION OF ANTIOXIDANT AND α -GLUCOSIDASE INHIBITORS FROM SALAM LEAVES

MUTIA DEVI HIDAYATI
NRP. 1412 201 025

Supervisor
SRI FATMAWATI, M.Sc., Ph.D
Prof. Dr. TASLIM ERSAM

MASTER PROGRAM
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCE
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2015

Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu gelar
Magister Sains (M.Si)
di
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh
Mutia Devi Hidayati
NRP.1412201025

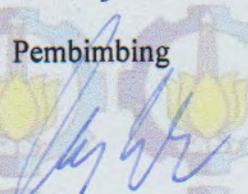
Tanggal Ujian 29 Januari 2015
Periode Wisuda Maret 2015

Disetujui oleh :

1. Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D
NIP. 1981011031 200212 2 001


Pembimbing

2. Prof.Dr. Taslim Ersam
NIP. 19520816 197903 1 004


Pembimbing

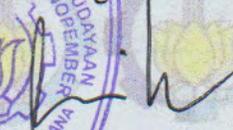
3. Prof.Dr. Mardi Santoso, Ph.D
NIP. 19650131 198910 1 001


Penguji

4. Suprpto, M.Si., Ph.D.
NIP. 19720919 199800 1 002


Penguji


Direktur Program Pasca Sarjana


Prof. Dr. Ir. Adi Soeprijanto, MT.
NIP. 1964045 1990021 001

PEMISAHAN DAN IDENTIFIKASI ANTIOKSIDAN DAN INHIBITOR α -GLUKOSIDASE DARI DAUN SALAM

Nama Mahasiswa : Mutia Devi Hidayati
NRP : 1412 201 025
Pembimbing : Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D
Prof. Dr. TaslimErsam

ABSTRAK

Daun salam merupakan obat herbal yang tumbuh di Asia Tenggara. Pada penelitian ini, 3,4,5-trihidroksi-asam benzoat dan senyawa benzofuran telah diisolasi dari ekstrak metanol *S. polyanthum* dengan metode ekstraksi, partisi dan kromatografi. Struktur kimia telah ditentukan menggunakan data spektroskopi ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR. Uji aktivitas antidiabetes dilakukan menggunakan α -glukosidase menunjukkan bahwa asam galat dapat dikatakan aktif sebagai antidiabetes. Aktivitas asam galat sebagai antidiabetes berkaitan erat dengan sifatnya sebagai antioksidan. Asam galat menunjukkan penghambatan antioksidan melalui DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) dan ABTS (2,2'-azinobis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) drazyl hydrate)

Kata kunci : α -glukosidase, DPPH, ABTS.

SEPARATION AND IDENTIFICATION OF ANTIOXIDANT, AND α -GLUCOSIDASE INHIBITORS FROM SALAM LEAVES

Student Name : Mutia Devi Hidayati
Student Identity Number : 1412 201 025
Supervisor : Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D
Prof. Dr. TaslimErsam

ABSTRACT

Syzygium polyanthum is a herbal medicine which is grown in South East Asia. In this study, 3,4,5-trihydroxy-benzoic acid and benzofuran compound puranol were isolated from methanol extract of *S. polyanthum* by extraction, partition and chromatography methods. The chemical structures were determined by using $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopic data. Antidiabetic activity was done with α -glucosidase showed that gallic acid could be active as antidiabetic. Activity of gallic acid as antidiabetic closely related to its antioxidant activity. Gallic acid showed antioxidant inhibition on D PPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) and ABTS (2,2'-azinobis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid))

Key words: α -glucosidase, DPPH, and ABTS.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Tesis yang berjudul **“Pemisahan dan Identifikasi Antioksidan dan Inhibitor α -Glukosidase Daun Salam ”**.

Dalam kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama riset S2 sehingga Tesis ini dapat terselesaikan. Ucapan terima kasih terutama disampaikan kepada :

1. Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D, selaku Dosen Pembimbing I yang telah banyak membantu dan membimbing dalam penulisan Tesis.
2. Prof. Dr. Taslim Ersam selaku Dosen Pembimbing II dan Kepala Lab Bahan Alam dan Sintesis yang telah berkenan memberikan nasehat, saran dan motivasi dalam penyelesaian Tesis.
3. Hamzah Fansuri, M.Si, Ph.D, selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA ITS.
4. Associate Prof. Kuniyoshi Shimizu, Ph.D, selaku Kepala Laboratorium *Systematic Forest and Forest Product Science*, Kyushu University, Fukuoka, Jepang atas dukungan riset, saran dan diskusi selama di Jepang.
5. Dikti atas hibah riset dan kerjasama luar negeri dan publikasi internasional
6. Ayah, Ibu, semua keluarga (om, tante, eyang) yang telah memberikan dukungan penuh selama mengerjakan Tesis ini.
7. Sahabat, rekan-rekan S2 angkatan 2012 atas kerjasamanya, serta semua pihak yang telah mendukung terselesainya penulisan naskah ini.

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari para pembaca. Akhir kata, penulis berharap naskah ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Surabaya, 9 Januari 2015

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTARTABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB I : PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan Penelitian	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Tinjauan Tanaman Salam	7
2.2 Manfaat Tanaman Salam	7
2.3 Tinjauan Kimiawi Tanaman Salam	8
2.4 Metode Pemisahan dan Pemurnian	11
2.4.1 Ekstraksi	11
2.4.2 Kromatografi Kolom	12
2.4.3 Kromatografi Cair Vakum	12
2.4.4 Kromatografi Lapis Tipis	12
2.4.5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	13
2.5 Tinjauan Spektroskopi NMR	14
2.5.1 Tinjauan Spektroskopi ¹ H-NMR	14
2.5.2 Tinjauan Spektroskopi ¹³ C-NMR	14
2.6 Tinjauan Diabetes Melitus	15
2.6.1 Tipe Diabetes Melitus	15

2.6.2.	Gejala, Penyebab dan Komplikasi Diabetes Melitus	16
2.6.3	Pengobatan Diabetes Melitus	17
2.7	Aktivitas Antidiabetes	18
2.7.1	Inhibisi Enzim α -Glukosidase	18
2.7.2	Inhibisi Enzim Aldosa reduktase	18
2.8	Tinjauan Antioksidan	19
2.8.1	Tinjauan DPPH	20
2.8.2	Tinjauan ABTS	21
2.9	Uji Aktivitas	21
2.9.1	Uji Aktivitas α -Glukosidase	21
2.9.2	Uji Aktivitas Aldosa reduktase	22
2.9.3	Uji Aktivitas DPPH	23
2.9.4	Uji Aktivitas ABTS	24
BAB III	: METODOLOGI	25
3.1	Alat dan Bahan	25
3.1.1	Alat	25
3.1.2	Bahan	25
3.2	Prosedur Penelitian Isolasi Senyawa <i>S. polyanthum</i>	26
3.2.1	Persiapan Bahan	26
3.2.2	Uji Pendahuluan	26
3.2.3	Uji Fitokimia	26
3.2.3.1	Uji Saponin.	26
3.2.3.2	Uji Tanin	26
3.2.3.3	Uji Flavonoid	26
3.2.3.4	Uji Alkaloid	27
3.2.3.5	Uji Triterpen	27
3.2.3.6	Uji Antrakuinon	27
3.2.3.7	Uji Karbohidrat	27
3.2.4	Isolasi Senyawa <i>S. polyanthum</i>	27
3.3	Pengujian dengan spektrometri	28
3.3.1	Spektroskopi NMR	28
3.4	Uji Aktivitas Biologis dari <i>S. polyanthum</i>	28

3.4.1	Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase	28
3.4.2	Aktivitas Penghambatan Aldosa reduktase	29
3.4.3	Aktivitas Penghambatan DPPH	30
3.4.4	Aktivitas Penghambatan ABTS	30
3.4.5	Analisis Statistik.	30
BAB IV	: HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1	Uji Pendahuluan dan Uji Fitokimia <i>S. polyanthum</i>	31
4.2	Aktivitas Biologis Ekstrak <i>S. polyanthum</i>	33
4.2.1	Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase	33
4.2.2	Aktivitas Penghambatan Aldosa reduktase	34
4.2.3	Aktivitas Penghambatan DPPH	34
4.2.4	Aktivitas Penghambatan ABTS	36
4.3	Isolasi Senyawa <i>S. polyanthum</i> ..	37
4.3.1	Ekstraksi Tanaman <i>S. polyanthum</i>	37
4.3.2	Fraksinasi Ekstrak Pekat Metanol	37
4.3.3	Fraksinasi Fraksi Etil asetat	40
4.3.4	Fraksinasi Fraksi Ea.D	43
4.3.5	Pemurnian Ea.D ₆ dan Ea.D ₅	46
4.4	Penentuan Struktur Senyawa	50
4.4.1	Penentuan Struktur Senyawa Ea.D ₆	50
4.4.2	Penentuan Struktur Senyawa Ea.D ₅ H	52
4.5	Aktivitas Biologis Senyawa Isolasi	55
4.5.1	Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase	55
4.5.2	Aktivitas Penghambatan Aldosa reduktase.	57
4.5.3	Aktivitas Penghambatan DPPH	58
4.5.4	Aktivitas Penghambatan ABTS	61
BAB V	: PENUTUP	65
5.1	Kesimpulan	65
5.2	Saran	65
	DAFTAR PUSTAKA	67
	LAMPIRAN	73
	BIODATA PENULIS	85

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul Tabel	Halaman
2.1	Klasifikasi tumbuhan Salam berdasarkan taksonomi.	7
2.2	Analisa Fitokimia dari Ekstrak <i>S. polyanthum</i>	9
4.1	Uji Fitokimia dari ekstrak metanol, etil asetat, <i>n</i> -heksana daun salam	32
4.2	Uji Fitokimia fraksi air, etil asetat dan <i>n</i> -heksana dari ekstrak metanol daun salam	33
4.3	Data ¹ H- NMR dan ¹³ C- NMR senyawa Ea.D ₆ (CD ₃ OD)	51
4.4	Data ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR senyawa Ea.D ₅ H(CD ₃ OD)	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul Gambar	Halaman
2.1	Tumbuhan Salam (<i>Syzygium polyanthum</i> Wight)	6
2.2	Jalur poliol	19
2.3	Reaksi antara DPPH dengan antioksidan.	20
2.4	Struktur Senyawa Trolox	21
2.5	Reaksi ABTS	21
4.1	Kromatogram hasil uji pendahuluan <i>S. polyanthum</i> dengan eluen DCM : MeOH (98 :2)	31
4.2	Aktivitas penghambatan aldosa reduktase pada ekstrak metanol <i>S. polyanthum</i>	34
4.3	Aktivitas DPPH dari ekstrak <i>S. polyanthum</i> pada konsentrasi 159,73 $\mu\text{g/mL}$, MeOH, ekstrak metanol; EA, ekstrak etil asetat; DCM, ekstrak diklorometan; Hx, ekstrak n-heksana dan T, trolox (kontrol positif). Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, n=3	35
4.4	Aktivitas penghambatan DPPH pada ekstrak methanol <i>S. polyanthum</i> .	35
4.5	Aktivitas ABTS dari ekstrak <i>S. polyanthum</i> pada konsentrasi 49,5 $\mu\text{g/mL}$, MeOH, ekstrak metanol; EA, ekstrak etilasetat; DCM, ekstrak diklorometan; HX, ekstrakn-heksana dan T, trolox (kontrolpositif). Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, n=3	36
4.6	Aktivitas penghambatan ABTS pada ekstrak methanol <i>S. polyanthum</i>	37
4.7	Aktivitas DPPH dari fraksi <i>S. polyanthum</i> pada konsentrasi 159,73 $\mu\text{g/mL}$ dan aktivitas ABTS dari fraksi <i>S. polyanthum</i> pada konsentrasi 49,5 $\mu\text{g/mL}$. Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, n=3	38
4.8	Aktivitas penghambatan DPPH pada fraksi etil asetat <i>S. polyanthum</i>	38

4.9	Aktivitas penghambatan ABTS pada fraksi etil asetat <i>S. polyanthum</i>	39
4.10	Aktivitas penghambatan α -Glukosidase pada konsentrasi 333 $\mu\text{g/mL}$ dari fraksi <i>S. polyanthum</i> . Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, n=3	39
4.11	Aktivitas penghambatan aldosa reduktase pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ dari fraksi <i>S. polyanthum</i> . Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, n=3	40
4.12	Kromatogram hasil fraksinasi fraksi etil asetat dengan eluen Hx : EA (75 : 25)	41
4.13	Kromatogram fraksi gabungan hasil fraksinasi fraksi etil asetat dengan eluen Hx : EA (75 : 25)	41
4.14	Aktivitas DPPH dari fraksi Etil asetat pada konsentrasi 159,73 $\mu\text{g/mL}$ dan aktivitas ABTS dari fraksi etil asetat pada konsentrasi 99 $\mu\text{g/mL}$ dari <i>S. polyanthum</i> . Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, n=3	42
4.15	Kromatogram fraksi Ea.D (1.Hx:CHCl ₃ 20:80, 2. Hx:CHCl ₃ 0:100, 3. CHCl ₃ :MeOH 50:50,4. CHCl ₃ :MeOH 0:100) dan fraksi Ea.F(1. Hx:CHCl ₃ 0:100, 2. CHCl ₃ :MeOH 80:20, 3. C HCl ₃ :MeOH 50:50, 4. C HCl ₃ :MeOH 0:100)	42
4.16	Kromatogram HPLC fraksi Ea-D	43
4.17	Kromatogram hasil fraksinasi fraksi Ea.D di elusi dengan eluenCHCl ₃ :MeOH (90:10)	44
4.18	Kromatogram fraksi gabungan hasil fraksinasi Ea.D dengan eluen CHCl ₃ : MeOH (90:10).	45
4.19	Aktivitas DPPH dari fraksi Ea.D <i>S. polyanthum</i> pada konsentrasi 159,73 $\mu\text{g/mL}$ dan aktivitas ABTS dari fraksi Ea.D <i>S. polyanthum</i> pada konsentrasi 49,5 $\mu\text{g/mL}$. Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, n=3.	45
4.20	Kromatogram HPLC fraksi Ea.D ₆	45

4.21	Kromatogram HPLC analitik fraksi Ea.D ₆ setelah dilakukan HPLC preparative menggunakan sistem isokratik H ₂ O :MeOH (50:50)	46
4.22	Kromatogram hasil uji tiga eluen yang berbeda kepolaran terhadap kristal Ea.D ₆	47
4.23	Hasil monitoring KLT senyawa Ea.D ₆ dengan senyawa 3,4,5-,trihidroksi asam benzoat	48
4.24	Kromatogram HPLC fraksi Ea.D ₅ menggunakan eluen H ₂ O :MeOH (50:50 → 30: 70)	49
4.25	Kromatogram HPLC analitik fraksi Ea.D ₅ menggunakan eluen H ₂ O : MeOH (80:20 → 30: 70)	49
4.26	StruktursenyawaEa.D ₆ (3,4,5-trihidroksiasam benzoat).....	51
4.27	Struktur senyawa Ea.D ₅ H 2,3-dihidro-2-(4-hidroksi-3-metoksi-fenil)-3-(hidroksilmetil)-7-metoksi-5-benzofuran propanol	54
4.28	Aktivitas penghambatan enzim α-glukosidase senyawa Ea.D ₆	55
4.29	Aktivitas penghambatan enzim aldosa reduktase senyawa Ea.D ₆	57
4.30	Aktivitas penghambatan DPPH senyawa Ea.D ₆	59
4.31	Aktivitas penghambatan DPPH senyawa Ea.D ₅ H	51
4.32	Aktivitas penghambatan ABTS senyawa Ea.D ₆	60
4.33	Aktivitas penghambatan ABTS senyawa Ea.D ₅ H	62

DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Arti Singkatan	Halaman
DM	Diabetes Melitus	1
DPPH	<i>2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate</i>	3
ABTS	<i>2,2'-azinobis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid).</i>	3
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	7
KLT	Kromatografi Lapis Tipis	10
KCKT	Kromatografi Cair Kimerja Tinggi	11
TMS	Tetra-metilsilan	12
IDDM	<i>Insulin Dependent Diabetes Melitus</i>	13
NIDDM	<i>Non Insulin Dependent Diabetes Melitus</i>	13
KKG	Kromatografi Kolom Grafitasi	25
KCV	Kromatografi Cair Vakum	25
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>	25
HRAR	<i>Human recombinant aldose reductase</i>	25

BAB I

PENDAHULUAN

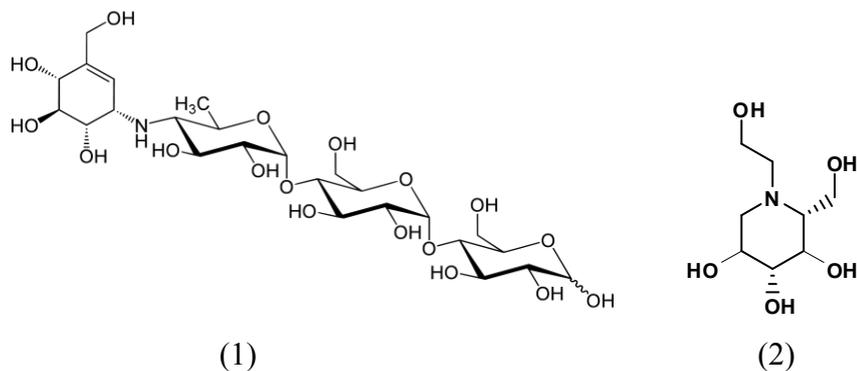
1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) merupakan salah satu penyakit degeneratif yang ditandai dengan menurunnya hormon insulin oleh organ pankreas. Penurunan hormon ini mengakibatkan metabolisme karbohidrat di dalam tubuh tidak dapat diproses secara sempurna, sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan kadar glukosa darah (Khan dkk, 2003). Diabetes melitus mengalami perkembangan sangat cepat tiap tahunnya. International Diabetes Federation (IDF) memperkirakan bahwa pada tahun 2013 di dunia terdapat 382 juta penderita diabetes dan jumlah ini akan meningkat menjadi 592 juta pada tahun 2035. Pada tahun 2013, Indonesia merupakan negara yang menempati peringkat ke-7 di dunia dengan jumlah penderita diabetes 8,5 juta (IDF, 2013). Berdasarkan etiologi dan pencegahannya, DM terbagi menjadi tiga tipe yaitu DM tipe 1, DM tipe 2 dan DM gestasional. Dari ketiga tipe DM tersebut, DM tipe 2 jumlah penderitanya mencapai 90-95 % dari keseluruhan populasi penderita diabetes. Besarnya jumlah penderita DM 2 tersebut disebabkan karena ketidakmampuan sel β langerhans dalam merespon insulin secara normal atau disebut dengan resistensi insulin (ADA, 2013).

Diabetes melitus tipe 2 memerlukan penanganan yang mencakup terapi non obat dan terapi obat. Terapi non obat untuk DM tipe 2 dapat dilakukan dengan pengaturan diet dan olahraga, sedangkan terapi obat dapat dilakukan dengan terapi obat hipoglikemik oral (Depkes RI, 2005). Dalam kerjanya obat hipoglikemik oral seperti golongan sulfonilurea, meglitinida, biguanid dan tiozolidindion memiliki beberapa efek samping bagi tubuh. Golongan obat tersebut dapat menimbulkan gangguan sistem pencernaan, hipoglikemik, dan peningkatan berat badan (Depkes RI, 2005). Sebagai alternatifnya, saat ini mulai banyak dikembangkan obat diabetes yang bekerja sebagai inhibitor katabolisme karbohidrat seperti inhibitor α -glukosidase dan aldosa reduktase.

Inhibitor α -glukosidase merupakan senyawa yang bekerja menghambat enzim α -glukosidase yang berperan dalam memecah karbohidrat menjadi glukosa.

Penghambatan tersebut menyebabkan pemecahan karbohidrat tertunda dan penyerapan glukosa menjadi terlambat sehingga menurunkan kadar glukosa darah (Van De Laar, 2008). Golongan inhibitor α -glukosidase yang saat ini telah banyak dijumpai yaitu akarbosa (1) dan miglitol (2) (Depkes RI, 2005) yang berfungsi efektif sebagai terapi obat pada penderita DM tipe 2. Pada umumnya senyawa yang dapat dijadikan sebagai inhibitor α -glukosidase adalah senyawa yang memiliki kemiripan struktur dengan substrat yang berikatan pada sisi aktif enzim. Pada kondisi ini inhibitor dan substrat akan berkompetisi untuk berikatan pada sisi aktif enzim. Substrat yang biasa digunakan adalah substrat yang memiliki ikatan glikosida, sehingga senyawa yang dapat dijadikan sebagai inhibitor α -glukosidase adalah senyawa yang memiliki ikatan glikosida.



Inhibitor aldosa reduktase merupakan senyawa yang bekerja menghambat enzim aldosa reduktase yang berperan dalam mengkatalisis reduksi glukosa menjadi sorbitol. Pada kondisi hiperglikemia, peningkatan sorbitol akan mengakibatkan terakumulasinya sorbitol dalam sel sehingga menyebabkan kerusakan sel dan terjadinya komplikasi diabetes seperti retinopati, nefropati dan neuropati diabetik (Logendra dkk, 2006) . Komplikasi tersebut sangat berhubungan dengan kondisi hiperglikemia yang terlibat dalam proses pembentukan radikal bebas melalui mekanisme glikasi nonenzimatik pada protein, jalur poliol sorbitol dan autooksidasi glukosa. Ketiga mekanisme tersebut akan mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif (Ueeno dkk, 2006). Senyawa reaktif dapat bereaksi dengan senyawa lain di dalam tubuh dan mengoksidasi asam nukleat, protein, lipid dan DNA sehingga mengakibatkan

ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan dalam tubuh yang dikenal sebagai stres oksidatif (Nuttall dkk, 1999).

Pencegahan stres oksidatif dapat dilakukan dengan meningkatkan suplai antioksidan di dalam tubuh. Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat menetralkan radikal bebas dan bekerja mendonorkan elektron untuk mencapai kondisi stabil sehingga dapat menghambat mekanisme oksidatif (Abheri dkk, 2010). Penghambatan tersebut dapat diketahui dengan melakukan uji aktivitas antioksidan dengan beberapa metode uji. Dalam penelitian ini akan dilakukan dua metode uji antioksidan yaitu metode uji DPPH (*2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate*) dan ABTS (*2,2'-azinobis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)*). Berdasarkan hasil uji aktivitas tersebut, banyak senyawa dan ekstrak yang dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan. Senyawa antioksidan diklasifikasikan menjadi dua yaitu antioksidan sintesis dan antioksidan alam. Dalam kerjanya antioksidan sintesis seperti *Butylated hydroxyanisole* (BHA) dan *Butylated hydroxytoluen* (BHT) memiliki efek samping bagi tubuh dan bersifat karsinogenik. Sebagai alternatifnya, saat ini banyak dikembangkan senyawa antioksidan yang berasal dari alam.

Pemanfaatan bahan kimiawi alam sebagai antioksidan banyak sekali ditemukan pada tanaman, sayur dan buah. Bahan kimiawi tersebut juga dapat digunakan untuk mendapatkan senyawa inhibitor katabolisme karbohidrat. Seiring perkembangan zaman, pemanfaatan bahan kimiawi sebagai antioksidan dan inhibitor katabolisme mengalami peningkatan. Salah satu bahan kimiawi yang dapat digunakan sebagai antioksidan dan inhibitor katabolisme adalah daun salam. (*Syzygium polyanthum* Wight). Tanaman ini dikenal oleh masyarakat sebagai bumbu masak karena aromanya yang khas. Selain itu daun salam dapat digunakan dalam bidang kesehatan dan obat-obatan karena memiliki berbagai macam bioaktivitas seperti antihipertensi (Ismiyati dkk, 2013), antijamur (Noveriza dkk, 2010), antimikroba dan sitotoksik (Kusuma dkk, 2011), antidiare (Nuratmi dkk, 1999) dan masih banyak beberapa lainnya. Tinjauan fitokimia dari ekstrak etanol daun salam telah dilaporkan mengandung senyawa karbohidrat, tanin, alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid (Kusuma dkk, 2011), polifenol (Lelono dkk, 2009), dan minyak atsiri (Noveriza dkk, 2010). Dalam uji fitokimia, perbedaan

pelarut yang digunakan untuk ekstraksi daun salam akan berpengaruh terhadap senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak. Sehingga dalam penelitian ini akan dilakukan uji fitokimia dari berbagai ekstrak dan fraksi untuk mengetahui senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi daun salam.

Berdasarkan penelitian oleh Studiawan dan Santosa (2005), ekstrak etanol daun salam dapat digunakan untuk menurunkan kadar glukosa darah pada mencit jantan yang diinduksi aloksan. Pada penelitian tersebut, Studiawan dan Santosa masih belum melakukan isolasi mengenai kandungan daun salam yang berkhasiat menurunkan kadar glukosa darah. Selain itu, sampai sekarang belum pernah ada penelitian mengenai aldosa reduktase dari daun salam. Oleh sebab itu, pada penelitian ini akan dilakukan isolasi dan identifikasi antioksidan dan inhibitor α -glukosidase dan aldosa reduktase dari ekstrak daun salam.

1.2 Permasalahan Penelitian

Penanganan diabetes dengan terapi obat hipoglikemik oral telah banyak digunakan oleh penderita diabetes. Namun dalam kerjanya obat tersebut memiliki efek samping bagi tubuh. Sebagai alternatifnya, saat ini dikembangkan obat diabetes yang bekerja sebagai inhibitor katabolisme karbohidrat seperti α -glukosidase dan aldosa reduktase. Pencarian dan penemuan senyawa kimia yang dapat digunakan sebagai inhibitor sangat diperlukan. Salah satunya yaitu dengan penggunaan daun salam sebagai sumber inhibitor katabolisme karbohidrat. Permasalahan yang akan diselesaikan dalam penelitian ini adalah mengungkapkan informasi ilmiah mengapa daun salam digunakan sebagai salah satu alternatif pengobatan antidiabetes dengan melakukan uji fitokimia, aktivitas biologis dari ekstrak dan fraksi daun salam, serta melakukan isolasi, identifikasi, uji aktivitas senyawa dari daun salam.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. mengetahui senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi daun salam

2. mengetahui aktivitas penghambatan antioksidan, α -glukosidase dan aldosa reduktase dari ekstrak dan fraksi daun salam.
3. isolasi senyawa dan aktivitas biologis penghambatan antioksidan, α -glukosidase dan aldosa reduktase dari ekstrak daun salam.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa ekstrak dan fraksi murni daun salam memiliki aktivitas penghambatan antioksidan, α -glukosidase dan aldosa reduktase. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah bahwa daun salam dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan diabetes.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tanaman Salam (*Syzygium polyanthum* Wight)

Syzygium polyanthum Wigh (sinonim *Eugenia polyantha* Wight dan *Eugenia lucidula* miq) merupakan salah satu tanaman famili Myrtaceae yang dikenal dengan sebutan pohon salam. Tanaman salam tumbuh liar di hutan dan pegunungan atau ditanam di pekarangan rumah. Pohonnya dapat ditemukan di dataran rendah hingga 1400 m di atas permukaan laut. Tanaman ini memiliki ciri fisik berupa pohon dengan ketinggian mencapai 25 m dan batangnya bulat. Daunnya bila diremas berbau harum, berbentuk lonjong sampai bulat telur, berdaun tunggal dengan posisi berhadapan. Tanaman salam memiliki kelopak bunga berbentuk cangkir, mahkota bunga berwarna putih. Akar tanaman salam termasuk akar tunggang, sedangkan buah salam berwarna merah gelap apabila telah masak, berbentuk bulat dengan diameter 8-9 mm (Dalimartha, 2000). Kedudukan tanaman salam dalam sistematika tumbuhan (taksonomi) diklasifikasikan seperti pada (Tabel 2.1).

Tabel 2.1 Klasifikasi tumbuhan salam berdasarkan taksonomi

Klasifikasi	Nama Taksonomi
Kingdom	Plantae
Divisio	Spermatophyta
Subdivisio	Angiospermae
Kelas	Dicotyledoneae
Subkelas	Dialypetalae
Ordo	Myrtales
Famili	Myrtaceae
Genus	<i>Myrtaceae</i>
Spesies	<i>Syzygium polyanthum</i>

2.2 Manfaat Tanaman Salam (*Syzygium polyanthum* Wight)

Tanaman salam (Gambar 2.1) merupakan salah satu alternatif obat tradisional. Bagian daunnya dapat dimanfaatkan untuk pengobatan berbagai jenis penyakit seperti kencing manis (Studiawan dkk, 2005), asam urat (Ariyanti dkk, 2007), antidiare (Nuratmi dkk, 1999 ; Malik dkk, 2013), dan antihipertensi

(Ismiyati dkk, 2013). Selain itu daun salam dapat digunakan sebagai pengharum aroma masakan karena aromanya yang khas. Bagian buahnya dapat digunakan untuk menetralkan efek mabuk karena mengonsumsi alkohol dan buahnya dapat juga dimakan. Kayu salam dapat dimanfaatkan sebagai bahan bangunan dan perabot rumah tangga. Kulit batang salam dapat digunakan sebagai pewarna jala dan anyaman bambu (Dalimartha, 2000).



Gambar 2.1 Tumbuhan Salam (*Syzygium polyanthum* Wight)

2.3 Tinjauan Kimiawi Tanaman Salam (*Syzygium polyanthum* Wight)

Syzygium (sinonim *Eugenia*) merupakan salah satu genus dari Famili Myrtaceae yang mengandung senyawa metabolit sekunder. Penelitian mengenai analisis fitokimia dari genus *Syzygium* mengandung senyawa flavonoid (Manaharan dkk, 2012), triterpenoid (Han dkk, 2012), tanin (Tanaka dkk, 1996), polifenol (Tian dkk, 2011) dan minyak atsiri (Victoria dkk, 2012). Beberapa senyawa tersebut memiliki bioaktivitas yang menarik seperti antimikrobia (Venkataranman dkk, 2008), dan antihiperlipidemia (Manaharan dkk, 2012).

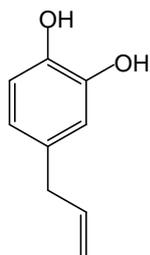
Daun salam merupakan salah satu genus *Syzygium* yang memiliki aktivitas antihiperlipidemia. Berdasarkan penelitian terdahulu mengenai analisis fitokimia tumbuhan salam (Tabel 2.2) dari ekstrak etanol mengandung senyawa karbohidrat, tanin, alkaloid, steroid, triterpenoid dan flavonoid (Kusuma dkk, 2011), polifenol (Lelono dkk, 2009) dan minyak atsiri (Noveriza dkk, 2010). Berdasarkan informasi bahwa ekstrak daun salam memiliki bioaktivitas yang beragam, maka tanaman ini mulai dikembangkan ke arah isolasi senyawa.

Tabel 2.2 Analisa Fitokimia dari Ekstrak *S. polyanthum*

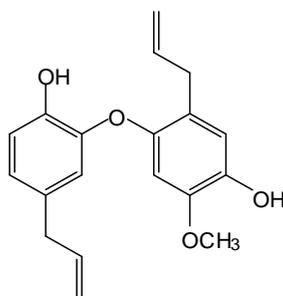
Fitokimia	Ekstrak tanaman		
	Buah salam matang	Buah salam belum matang	Daun salam
Saponin	+	-	-
Karbohidrat	+	+	+
Tannin	+	+	+
Alkaloid	+	+	+
Steroid	-	+	+
Triterpenoid	+	+	+
Flavonoid	+	+	+

(Kusuma dkk, 2011)

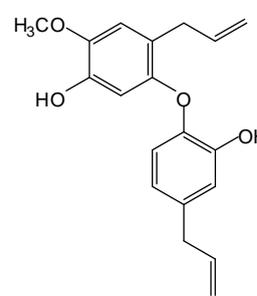
Pada tahun 2013, Kato dkk melakukan isolasi senyawa murni dari ekstrak metanol daun salam. Ekstrak tersebut dipartisi dengan etil asetat dan aquades. Senyawa-senyawa yang terkandung dalam fasa etil asetat difraksinasi dengan eluen campuran (Hx : Ea 2 : 1, Hx : Ea 1 : 1, Ea dan MeOH) sehingga diperoleh 4 fraksi gabungan (F1-F4). Fraksi F1 difraksinasi lebih lanjut dengan kromatografi kolom menggunakan eluen campuran CHCl_3 : MeOH (60 : 1, 30 : 1, 4 : 1). Fraksi-fraksi tersebut dimonitoring dengan KLT dan diperoleh empat fraksi gabungan (F1.1-F1.4). Pemurnian fraksi F1.4 diperoleh senyawa hidroksikacivol (3) dan fraksi F1.2 dimurnikan dengan KLT-p menggunakan eluen (Hx: Ea 2 : 1) dan diHPLC sehingga diperoleh senyawa 4-allil-1-hidroksi-2-(2' allil-4'-hidroksi-5'-metoksifenoksi) benzen (4), 4-allil-2-hidroksi-2-(2'allil-4'-hidroksi-5'-metoksifenoksi) benzen (5).



(3)

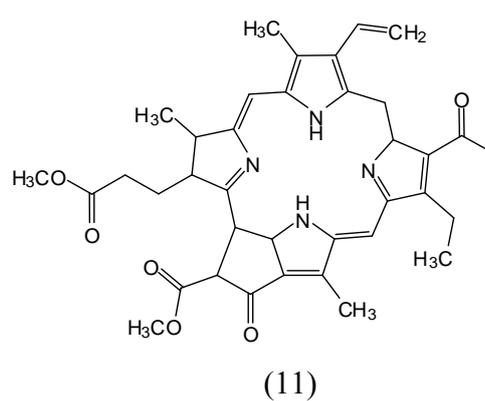
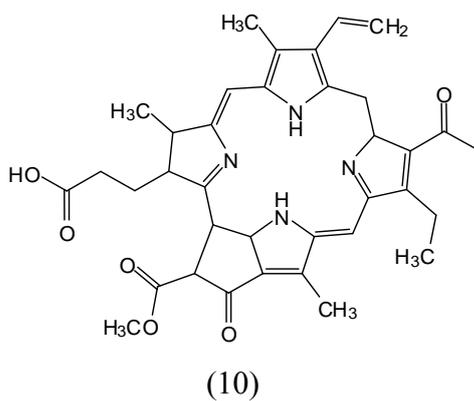
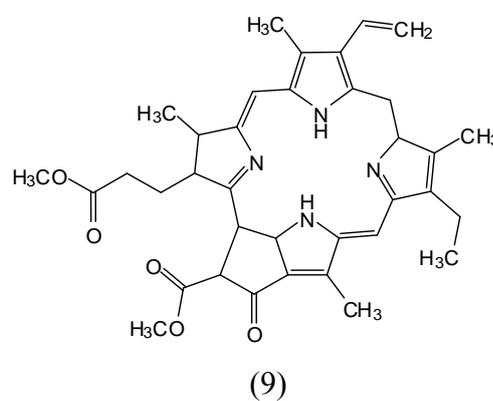
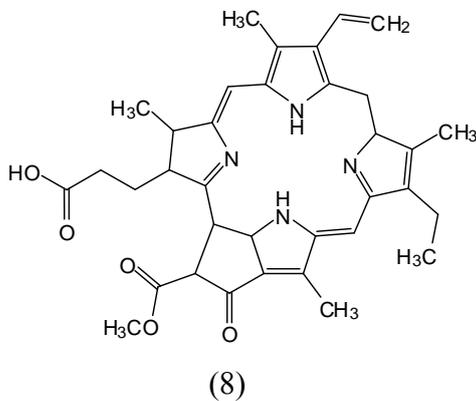
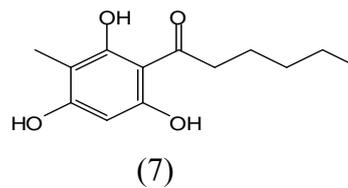
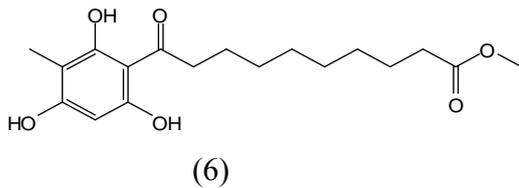


(4)



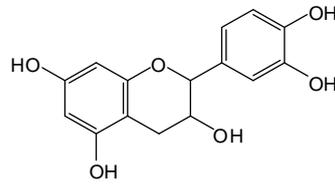
(5)

Isolasi senyawa daun salam dari ekstrak metanol pada fraksi etil asetat diperoleh dua senyawa baru yaitu anthuminoate (6), anthuminone (7) dan empat senyawa lain yang telah diketahui sebelumnya yaitu pheophorbide-a (8), metil hidropheophorbide-a (9), pheophorbide-b (10), metil hidropheophorbide-b (11) (Har dkk, 2012).

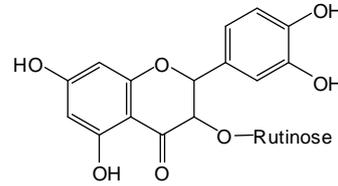


Lelono dkk, (2013) melakukan isolasi senyawa murni dari ekstrak metanol air kulit batang salam. Ekstrak tersebut dipartisi dengan *n*-heksana, kloroform, etil asetat, aseton, butanol dan metanol. Fraksinasi pada fraksi butanol diperoleh

senyawa katekin (12) dan fraksinasi pada fraksi kloroform diperoleh senyawa rutin (13).



(12)



(13)

2.4 Metode Pemisahan dan Pemurnian

2.4.1 Ekstraksi

Ekstraksi yaitu teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kelarutan dalam pelarut tertentu. Distribusi pemisahan tersebut mengikuti prinsip “*like or dislike*” yang berdasarkan pada perbedaan kepolaran. Berdasarkan bentuk campurannya, ekstraksi dibagi menjadi dua yaitu : ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair (Kristanti dkk., 2008). Teknik pemisahan didasarkan atas tiga cara, yaitu :

1. Metode maserasi, yaitu suatu teknik ekstraksi dengan cara perendaman bahan yang sudah halus pada temperatur kamar dengan pelarut yang sesuai supaya zat-zat dapat larut secara sempurna.
2. Metode sokletasi, yaitu teknik ekstraksi dengan menggunakan alat soklet. Pelarut pada “*flash bottom*” diuapkan dan mengalami kondensasi setelah sampai di kondensor kemudian jatuh bersama ke tempat cuplikan, selanjutnya bersama ekstrak turun kembali ke dalam “*flash bottom*”. Proses ini berlangsung secara kontinu dan terjadi berulang-ulang.
3. Metode perkolasi, yaitu metode ekstraksi dengan bahan yang sudah halus diekstraksi dalam pelarut yang sesuai dengan cara mengalirkan pelarut secara perlahan-lahan ke dalam suatu kolom yang berisi cuplikan.

Bahan alam dapat diekstraksi dengan menggunakan suatu pelarut yang bersifat non-polar atau polar seperti *n*-heksana, eter, benzen, kloroform, diklorometana, aseton, metanol dan etil asetat (Pavia dkk, 1995).

2.4.2 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan teknik pemisahan preparatif berdasarkan distribusi kelarutan dan daya absorpsi bahan antara fasa gerak dan fasa diam dalam suatu kolom. Kromatografi kolom sangat dipengaruhi oleh pemilihan adsorben, eluen atau pelarut, dimensi kolom, serta kecepatan elusi yang digunakan (Kristanti dkk, 2008). Pada umumnya adsorben yang digunakan dalam kromatografi kolom berupa silika atau alumina. Eluen yang digunakan adalah pelarut nonpolar ataupun campuran antara keduanya yang dapat mengelusi campuran (Roy, 1991). Perbedaan kepolaran senyawa menyebabkan perbedaan kecepatan turun. Senyawa yang kepolarannya lebih rendah akan turun terlebih dahulu daripada senyawa yang kepolarannya lebih tinggi. Hal ini terjadi karena perbedaan kekuatan adsorpsi oleh fasa diam terhadap tiap-tiap komponen dalam larutan (Poole dkk, 1991).

2.4.3 Kromatografi Cair Vakum

Kromatografi Cair Vakum merupakan kromatografi kolom khusus yang biasanya menggunakan silika gel sebagai adsorben. Alat yang digunakan adalah corong Buchner berkaca masir atau kolom pendek dengan diameter yang cukup besar (Kristanti dkk, 2008). Sampel dilarutkan dalam pelarut yang sesuai kemudian sampel diimpreg dalam silika dan dimasukkan ke dalam kolom yang sudah disiapkan. Kolom dielusi dalam pelarut dengan perbandingan kepolaran tertentu dan divakum perlahan-lahan. Hasil yang didapatkan adalah pemisahan sampel dalam fraksi-fraksi yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya (Hardjosudirjo, 1991).

2.4.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis merupakan kromatografi serapan berdasarkan pada prinsip adsorpsi. Pada umumnya adsorben yang digunakan adalah silika gel dan alumina. Pemilihan eluen untuk KLT tergantung pada adsorben yang digunakan dan jenis senyawa dalam sampel. Parameter dasar yang digunakan untuk karakterisasi posisi daerah sampel dalam KLT adalah faktor penghambat (*reterdation factor*) atau nilai R_f . Nilai ini menggambarkan perbandingan jarak

migrasi sampel dibandingkan migrasi bidang pelarut. Kondisi batas untuk nilai R_f adalah $0 < R_f < 1$. Jika $R_f = 0$, noda tidak bergerak dari titik awal, dan jika $R_f = 1$, noda tidak ditahan oleh fasa stasioner dan bergerak dengan eluen (Poole dkk., 1991). Kromatogram lapis tipis (KLT) dapat digunakan untuk mengetahui apakah senyawa telah murni. Hal ini dapat diketahui dari bentuk noda pada plat. Jika noda yang tampak berupa noda tunggal, maka senyawa tersebut sudah tidak bercampur dengan senyawa lainnya. Senyawa dapat dikatakan murni apabila dengan uji KLT menggunakan 3 m acam eluen yang berbeda kepolaran tetap menunjukkan 1 noda dengan R_f yang berbeda dan memiliki perbedaan titik leleh ± 1 °C (Kristanti dkk., 2008).

2.4.5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan salah satu teknik pemisahan dengan metode analisis terbaru dengan beberapa kelebihan, diantaranya kecepatan analisis, resolusi baik, kepekaan yang tinggi, sampel tidak mudah terdekomposisi, kolom dapat digunakan kembali, dan dapat menggunakan bermacam-macam detektor. Pada dasarnya instrumentasi KCKT terdiri dari pompa, injektor, kolom, detektor, fase gerak, komputer atau integrator.

Dalam KCKT, fase gerak biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur secara keseluruhan. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang murni dan dapat melarutkan sampel. Kemampuan elusi sampel ditentukan dari polaritas campuran pelarut, polaritas fase diam dan sifat komponen. Pada fase normal biasanya fase diam lebih polar daripada fase gerak, sedangkan untuk fase terbalik, fase diam kurang polar daripada fase gerak. Proses elusi dapat dilakukan dengan cara isokratik yaitu dengan komposisi fase gerak tetap selama elusi, atau dengan cara bergradien yaitu dengan komposisi fase gerak berubah-ubah selama elusi (Kenkel dkk., 2008).

Pompa dalam KCKT digunakan untuk menghantarkan fase gerak melalui kolom. Ada dua pompa yang digunakan yaitu pompa dengan tekanan konstan dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan (Munson, 1981). Kolom merupakan tempat berlangsungnya proses pemisahan suatu analit. Kolom yang biasa digunakan untuk pemisahan yaitu kolom konvensional yang didalamnya terdapat

fase diam berupa silika seperti gugus silanol (Si-OH) yang bersifat polar, dan oktadesil silika (ODS atau C18) bersifat nonpolar (Kealey, 2002). Detektor KCKT yang umum digunakan adalah detektor UV. Senyawa organik biasanya menyerap di daerah UV. Panjang gelombang yang sering digunakan adalah 254 nm karena senyawa organik memberikan serapan di daerah tersebut (Wonorahardjo, 2013).

2.5 Tinjauan Spektroskopi NMR

Spektrometri Resonansi Magnetik Inti merupakan pengukuran spektroskopi yang didasarkan pada sifat magnet inti atom, yaitu gelombang radio oleh inti tertentu dalam molekul dengan medan magnet yang sangat kuat. Pengukuran tersebut akan menghasilkan spektrum yang selanjutnya dilakukan elusidasi struktur. Daerah spektrum NMR dibagi atas dua bagian yang dibandingkan dengan TMS (tetra-metilsilan) yang berada pada $\delta=0$ ppm, yaitu daerah *up-field* (mendekati TMS) dan *down-field* (menjauhi TMS). Apabila lingkungan sekitar atom tersebut bersifat melindungi (*shielding*) dari (B_0) akan sulit terjadi resonansi, maka peak atom akan muncul pada daerah *up-field* (mendekati TMS). Apabila lingkungan sekitar atom tersebut bersifat membuka (*deshielding*) terhadap (B_0) akan mudah terjadi resonansi, maka peak atom tersebut akan muncul pada daerah *downfield* (menjauhi TMS) (Pavia dkk., 1990). Perbandingan antara letak resonansi suatu proton atau karbon dengan letak resonansi proton atau karbon standar disebut pergeseran kimia (Hart, 1983).

2.5.1 Tinjauan Spektroskopi ^1H -NMR

Dalam resonansi magnet inti, yang banyak digunakan adalah inti hidrogen (^1H). Spektrometer ^1H -NMR merupakan metode penting dalam identifikasi struktur karena dapat memberikan informasi tentang berbagai jenis dan jumlah proton, serta lingkungan kimia dari atom hidrogen dan struktur gugus yang berdekatan pada tiap atom hidrogen dalam molekul (Mulya dan Suharman, 1995).

2.5.2 Tinjauan Spektroskopi ^{13}C -NMR

Spektroskopi ^{13}C -NMR menghasilkan informasi struktur mengenai atom karbon dalam sebuah molekul organik. Spektro ^{13}C -NMR digunakan untuk mengidentifikasi jumlah karbon yang terdapat dalam molekul dengan semua pergeseran kimianya sehingga dapat mengetahui sifat lingkungannya.

2.6 Tinjauan Diabetes Melitus

2.6.1 Tipe Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit gangguan metabolisme akibat tidak berfungsinya sel β pankreas di pulau langerhans untuk mensekresikan insulin. Gangguan tersebut menyebabkan terjadinya peningkatan kadar glukosa dalam darah (Khan dkk, 2003). Menurut International Diabetes Federation (IDF, 2013), terdapat tiga tipe DM berdasarkan etiologi dan pengobatannya, yaitu DM tipe 1, DM tipe 2 dan DM gestational.

1. DM tipe 1 (*Insulin Dependent Diabetes Melitus* IDDM) merupakan gangguan insulin yang terjadi karena rusaknya sel β Langerhans akibat reaksi autoimun. Penderita DM tipe 1 mencapai 5-10% dari keseluruhan populasi penderita diabetes. Pada kondisi ini, sel β Langerhans mengalami kerusakan secara permanen sehingga penderita menghasilkan sedikit insulin atau sama sekali tidak menghasilkan insulin. Dalam jangka panjang, DM tipe 1 mengakibatkan terjadinya komplikasi ketoasidosis (ADA, 2013). Umumnya DM tipe 1 ini terjadi pada anak-anak dan remaja, sedangkan pengobatan DM tipe 1 yaitu dengan terapi insulin (Khan dkk, 2003).
2. DM tipe 2 (*Non Insulin Dependent Diabetes Melitus* NIDDM) merupakan gangguan yang terjadi karena sel-sel sasaran insulin tidak mampu merespon insulin secara normal atau disebut sebagai resistensi insulin. Penderita DM tipe 2 mencapai 90-95 % dari keseluruhan populasi penderita diabetes. Faktor genetik dan pengaruh lingkungan seperti obesitas, asupan kalori dan aktivitas fisik yang rendah dapat menyebabkan terjadinya DM tipe 2 (ADA, 2013). Umumnya DM tipe 2

terjadi pada orang yang berusia diatas 40 tahun dan pengobatannya dapat dikontrol dengan obat hipoglikemik (Khan dkk, 2003).

3. DM Gestasional merupakan gangguan pada kehamilan normal yang disertai peningkatan resistensi insulin. Glukosa darah akan kembali normal bila sudah melahirkan, akan tetapi resiko untuk terkena DM tipe 2 cukup besar (IDF, 2013).

2.6.2 Gejala, Penyebab dan Komplikasi Diabetes Melitus

Gejala yang timbul pada penderita DM tidaklah sama antara satu penderita dengan penderita lainnya. Ada tiga gejala umum yang sering terjadi pada penderita DM. Poliurie (sering buang air kecil), polidipsi (sering merasa haus), poliphaghi (sering merasa lapar) (Makheswari dkk, 2012) . Secara medis terganggunya hormon insulin atau kurang sensitifnya jaringan tubuh terhadap insulin akan mempengaruhi glukosa darah. Ada beberapa faktor lain yang menjadi pemicu penyakit DM, yaitu faktor genetik, faktor pola hidup (pola makan yang salah dan olahraga), virus, obesitas (Depkes RI, 2005). Dalam jangka panjang, penyakit DM dapat mengakibatkan kerusakan pada sistem tubuh dan berbagai komplikasi yang bersifat akut dan kronis.

Hipoglikemia merupakan komplikasi yang pada umumnya terjadi pada penderita DM tipe 1 yang memiliki kadar glukosa darah yang rendah. Hal ini menyebabkan sel-sel otak tidak mendapatkan sumber energi, sehingga sistem otak tidak dapat berfungsi (Depkes RI, 2005). Hiperglikemia merupakan keadaan dimana kadar glukosa darah meningkat tajam dan mengakibatkan terjadinya ketoasidosis (Pischke, M.A., 2001). Komplikasi mikrovaskuler terjadi karena lemahnya dinding pembuluh darah sehingga terjadi penyumbatan pada pembuluh darah kecil dan menyebabkan kerusakan pada beberapa sistem organ seperti, retinopati, nefropati, dan neuropati (Fowler, 2008). Tiga jenis komplikasi makrovaskuler yang berkembang pada penderita DM adalah penyakit jantung koroner, penyakit pembuluh darah otak dan penyakit pembuluh darah perifer (Depkes RI, 2005).

2.6.3 Pengobatan Diabetes Melitus

Dalam upaya penyembuhan DM, terdapat dua jenis terapi pengobatan yaitu terapi non obat dan terapi obat. Pengobatan DM dengan terapi obat berupa terapi insulin dan obat hipoglikemia oral. Dalam pengobatan DM, insulin digunakan untuk penderita DM tipe 1, akan tetapi insulin juga digunakan untuk DM tipe 2 apabila kontrol glukosa masih buruk dengan pemberian obat oral antidiabetes. Berikut penggolongan obat oral hipoglikemia berdasarkan mekanisme kerjanya (Depkes RI, 2005).

a. Obat yang dapat meningkatkan sekresi insulin

Obat golongan sulfonilurea dan meglitinida bekerja menstimulasi sel β pankreas sehingga meningkatkan sekresi insulin. Efek samping dari obat golongan ini adalah gangguan pada pencernaan dan gangguan syaraf pusat. Obat yang termasuk golongan sulfonilurea adalah gliburida, glipizida, glikazida, glimeperida dan glikuidon. Obat yang termasuk dalam golongan meglitinida ini adalah repaglinida dan nateglinida (Depkes RI, 2005).

b. Obat yang dapat meningkatkan sensitifitas sel terhadap insulin.

Obat golongan biguanida dan tiozolindindion bekerja menurunkan glukosa pada hati (Lorenzati dkk, 2010), meningkatkan kepekaan insulin dari otot, jaringan lemak sehingga meningkatkan sensitivitas sel terhadap insulin (Peterson dkk, 2000). Efek samping penggunaan obat biguanida adalah gangguan sistem pencernaan, muntah, diare, sedangkan efek samping penggunaan obat tiozolindindion adalah peningkatan berat badan, LDL kolesterol tinggi. Salah satu obat golongan biguanida adalah metformin dan obat golongan tiozolindindion adalah pioglitazon dan rosiglitazon (Depkes RI, 2005).

c. Inhibitor katabolisme karbohidrat yaitu inhibitor α -glukosidase. Obat golongan ini bekerja menghambat enzim α -glukosidase yang berfungsi menghidrolisis oligosakarida. Inhibisi enzim ini dapat mengurangi pencernaan karbohidrat sehingga dapat mengurangi kadar glukosa darah. Obat yang termasuk golongan ini adalah akarbose dan miglitol (Lorenzati dkk, 2005).

2.7. Aktivitas Antidiabetes

2.7.1 Inhibisi Enzim α -glukosidase

Enzim α -glukosidase (EC 3.2.1.20, α -D-glukosida glukohidrolase) merupakan enzim karbohidrase yang mengkatalis pembebasan glukosa dari substrat gula non-pereduksi dengan memecah ikatan glikosida (Kim dkk, 2008). Enzim α -glukosidase dapat dimanfaatkan sebagai terapi alternatif pengobatan diabetes dengan memperlambat penyerapan glukosa melalui penghambatan karbohidrat yaitu dengan menghidrolisa enzim glukosidase dan amilase dalam saluran pencernaan (Braun dkk, 1995). Enzim α -glukosidase dapat berfungsi efektif sebagai agen kemoterapi untuk penggunaan klinis dalam pengobatan diabetes dan obesitas.

Adapun senyawa yang dapat dijadikan sebagai inhibitor α -glukosidase memiliki beberapa karakteristik sebagai berikut :

1. Memiliki kemiripan struktur glukosa
2. Memiliki kemampuan membentuk ikatan ion dengan nukleofil
3. Memiliki struktur dengan transisi state
4. Memiliki kemampuan untuk membentuk ikatan hidrogen dengan residu asam sebagai katalis
5. Memiliki kemampuan untuk berinteraksi ionik dan hidrofobik pada sisi selain sisi aktif
6. Memiliki kemampuan untuk membentuk ikatan kovalen dengan enzim melalui gugus epoksi atau aziridin.

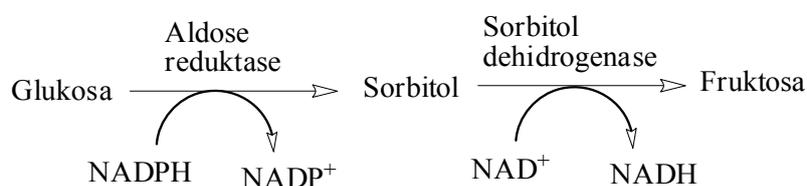
(Hakamata dkk, 1995).

2.7.2 Inhibisi Enzim Aldosa reduktase

Aldosa reduktase (alditol : NAD(P)⁺ 1-oksidoreduktase, EC 1.1.1.2.1) merupakan enzim pertama dalam jalur poliol. Jalur ini memiliki peranan penting dalam mengatur glukosa darah. Enzim aldosa reduktase bekerja untuk mengkatalis proses reduksi glukosa menjadi sorbitol dengan adanya oksidasi NADPH menjadi NADP⁺. Peningkatan kadar glukosa dalam jalur poliol akan menyebabkan produksi sorbitol lebih cepat. Sorbitol yang dihasilkan tidak dapat melewati membran sel sehingga terakumulasi dalam sel. Akumulasi sorbitol ini

menyebabkan kerusakan sel dan terjadinya komplikasi diabetes seperti neuropti, nefropati, retinopati dan katarak (Logendra dkk, 2006).

Pada kondisi glukosa normal, aldosa reduktase berperan sebagai enzim yang mengurangi aldehyd beracun di dalam sel menjadi alkohol non aktif. Pada kondisi hiperglikemia, glukosa darah intraseluler mengalami peningkatan sehingga enzim akan mengkonversi glukosa menjadi sorbitol dengan penurunan NADPH. Pada saat yang sama, sorbitol teroksidasi menjadi fruktosa oleh sorbitol dehidrogenase (SDH) menyebabkan peningkatan NADH (Logendra dkk, 2006).



Gambar 2.2 Jalur polioli

2.8 Tinjauan Antioksidan

Radikal bebas adalah suatu senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif sehingga dapat menyerang elektron molekul lain. Radikal bebas tersebut dapat mengoksidasi asam nukleat, protein, lemak, DNA sel dan menginisiasi munculnya penyakit degeneratif. Apabila jumlah radikal bebas sangat berlebih sedangkan jumlah antioksidan tetap, maka radikal bebas tidak dapat dinetralkan. Dampak reaktifitas radikal bebas yang tidak bisa dinetralkan dapat menyebabkan kerusakan sel, penyakit autoimun, penyakit degeneratif seperti kanker, jantung, aterosklerosis, dan diabetes (Abheri dkk, 2010).

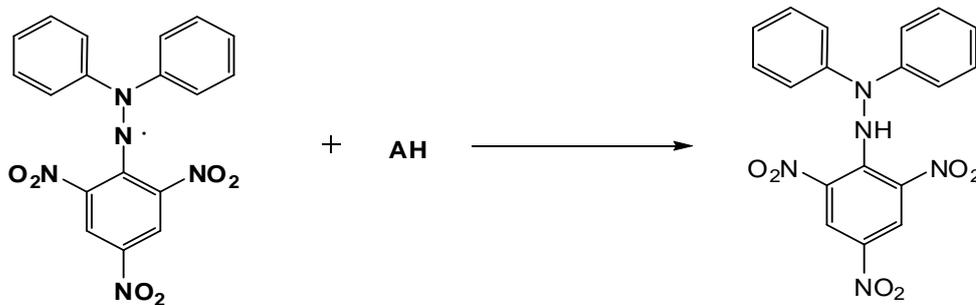
Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menetralkan radikal bebas. Senyawa tersebut bekerja dengan mendonorkan elektron untuk mencapai kondisi yang stabil sehingga dapat menghambat mekanisme oksidatif (Abheri dkk, 2010). Senyawa antioksidan dapat digolongkan menjadi :

1. Antioksidan primer merupakan antioksidan yang terdapat dalam tubuh manusia seperti enzim superoksida dismutase, katalase dan glutathion peroksidase.

2. Antioksidan sekunder merupakan antioksidan yang terdapat di luar tubuh seperti senyawa dari bahan alam. Senyawa tokoferol, vitamin C, beta karoten, flavonoid dan fenolat.
3. Antioksidan tersier merupakan antioksidan yang terbentuk dari hasil sintesis seperti *Butylated Hydroxyanisole* (BHA), *Butylated Hydroxytoluen* (BHT) (Kumalaningsih, 2006).

2.8.1 Tinjauan DPPH

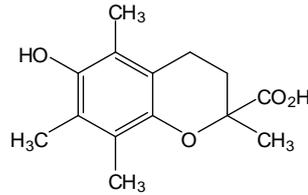
DPPH merupakan singkatan dari senyawa kimia yaitu 1,1-diphenil-2-picrylhydrazil yang memiliki sifat sebagai radikal bebas. Senyawa ini akan bereaksi dengan antioksidan yang akan mendonorkan satu elektronnya sehingga membentuk senyawa yang lebih stabil.



Gambar 2.3 Reaksi antara DPPH dengan antioksidan

Gambar 2.3 menunjukkan prinsip kerja dari DPPH, dimana elektron yang tidak berpasangan akan berinteraksi dengan atom hidrogen yang berasal dari antioksidan. Interaksi tersebut menyebabkan perubahan warna serapan maksimum dari ungu menjadi kuning pada panjang gelombang 515 nm (Zurowska dkk, 2012).

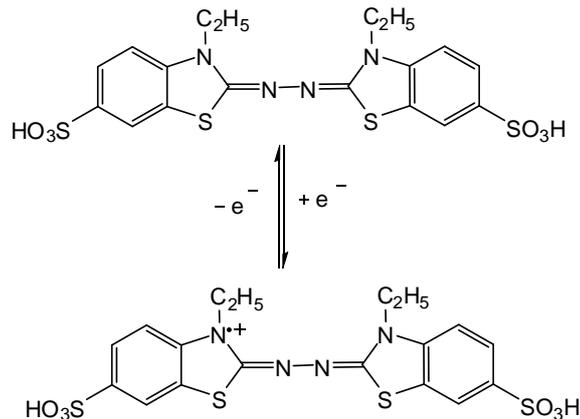
Trolox (*6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid*) adalah senyawa turunan vitamin E yang memiliki sifat sebagai antioksidan. Senyawa ini biasanya digunakan sebagai standar atau kontrol positif dalam uji antioksidan (Cos dkk, 2003). Trolox digunakan untuk terapi oksidatif pada proses kematian sel saraf dan penuaan, selain itu senyawa ini sangat efektif dalam terapi pengobatan kanker (Diaz dkk, 2007).



Gambar 2.4 Struktur Senyawa Trolox

2.8.2 Tinjauan ABTS

ABTS merupakan singkatan dari senyawa kimia 2,2'-azinobis (3-ethyl benzothiazoline-6- sulfonic acid) yang memiliki sifat sebagai radikal kation. ABTS adalah suatu radikal dengan pusat nitrogen yang memiliki karakteristik warna biru. Apabila ABTS tereduksi oleh antioksidan akan berubah menjadi bentuk nonradikal dan tidak berwarna. ABTS merupakan metode spektrometri yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan. Prinsip dari ABTS adalah dekolorisasi radikal kation yang diukur pada panjang gelombang 734 nm (Zurowska dkk, 2012).



Gambar 2.5 Reaksi ABTS

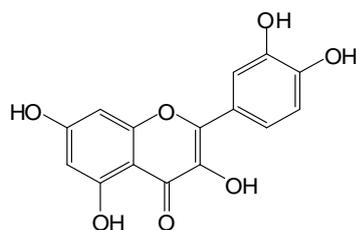
2.9. Uji Aktivitas

2.9.1 Uji Aktivitas α -Glukosidase

Secara kemitoksonomi, tumbuhan salam mengandung senyawa karbohidrat, tanin, alkaloid, steroid, triterpenoid dan flavonoid (Kusuma dkk, 2011), polifenol (Lelono dkk, 2009) dan minyak atsiri (Noveriza dkk, 2010). Ekstrak metanol-air pada *S. polyanthum* menunjukkan aktivitas penghambatan α -

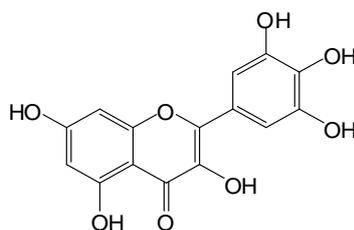
glukosidase. yang lebih besar dengan IC_{50} 71 $\mu\text{g/mL}$ daripada ekstrak metanol 92 $\mu\text{g/ml}$ dan ekstrak air 73 $\mu\text{g/mL}$ (Lelono dkk, 2013).

Pengaruh inhibisi dari senyawa turunan flavonoid dan fenolat dapat diketahui melalui analisis *docking*. Senyawa kuersetin (14) $IC_{50} = 1,0 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ > mirisetin (15) = $3,2 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ > rutin (13) = $84,1 \pm 4,1 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki aktivitas inhibisi α -glukosidase yang lebih besar dibandingkan akarbosa (1) = $140,5 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ sebagai kontrol positif (Hyun dkk, 2014).



(14)

$IC_{50} = 1,00 \mu\text{g/mL}$



(15)

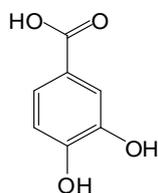
$IC_{50} = 3,2 \mu\text{g/mL}$

Senyawa rutin (13), kuersetin (14) dan mirisetin (15) memiliki potensi sebagai inhibitor α -glukosidase. Rutin berinteraksi dengan residu α -glukosidase dari Glu322, Lys324, dan Asp325, dengan energi ikat -8.2 kcal/mol. Kuersetin berinteraksi dengan residu α -glukosidase dari Asp325 dan Asp521 memiliki energi ikat -8.0 kcal/mol, selain itu residu Lys324 digunakan untuk membentuk interaksi Vander Waals untuk menstabilkan interaksi kuersetin dengan α -glukosidase. Sedangkan senyawa mirisetin memiliki empat ikatan hidrogen yang berinteraksi dengan residu α -glukosidase dari Glu322, Lys324, Asp325, dan Asp521 dengan energi ikat -7.7 kcal/mol (Hyun dkk, 2014).

2.9.2 Uji Aktivitas Aldosa Reduktase

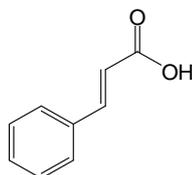
Aldosa reduktase memiliki kemampuan untuk berikatan dengan NADPH dan gliseraldehid melalui residu histidin-110 dan tirosin-48, yang berlokasi didekat nukleotida (Halder dkk, 1984). Senyawa fenolat seperti kuersetin (14), 3,4-dihidroksi asam benzoat (16), dan trans-asam sinamat (17) menunjukkan aktivitas aldosa reduktase yang lebih besar masing-masing dengan nilai $IC_{50} = 25,2 \pm 2,2 \mu\text{g/mL}$, $42,7 \pm 3,2 \mu\text{g/mL}$, dan $68,1 \pm 4,8 \mu\text{g/mL}$. Senyawa 3,4,5-

trihidroksi asam benzoat (18) memiliki aktivitas penghambatan > senyawa 3,5-dimetoksi-4-hidroksi asam benzoat (19) > trans-4-hidroksi asam sinamat (20) (Chethan dkk, 2008).



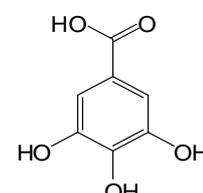
(16)

$$IC_{50} = 42,7 \mu\text{g/mL}$$



(17)

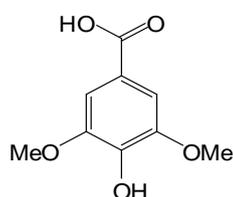
$$IC_{50} = 68,1 \mu\text{g/mL}$$



(18)

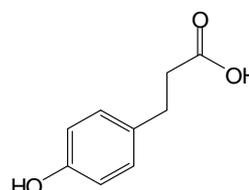
$$IC_{50} = 97,3$$

$\mu\text{g/mL}$



(19)

$$IC_{50} = 172,1 \mu\text{g/mL}$$

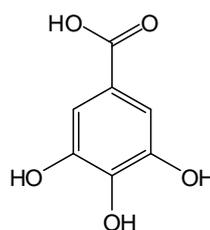


(20)

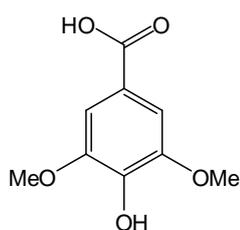
$$IC_{50} = 162,3 \mu\text{g/mL}$$

2.9.3 Uji Aktivitas Penghambatan DPPH

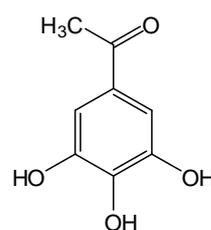
Aktivitas penghambatan antioksidan dari senyawa turunan fenolat telah dilaporkan oleh Zhongbing dkk, 2006. Berdasarkan penelitian, uji aktivitas DPPH dilakukan pada beberapa senyawa turunan fenolat. Hasil dari uji antioksidan menunjukkan bahwa senyawa asam galat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih besar dibandingkan dengan asam siringat, metil galat dan propil galat. Senyawa asam galat (18) memiliki penghambatan DPPH > asam siringat (19) > metil galat (21) > propil galat (22) (Zhongbing dkk, 2006).



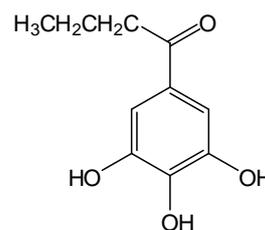
(18)



(19)



(21)



(22)

IC₅₀ 6,0 μM

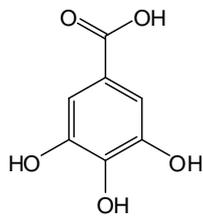
IC₅₀ 7,3 μM

IC₅₀ 7,2 μM

IC₅₀ 8,2 μM

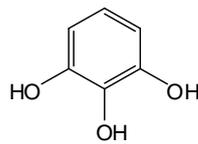
2.9.4 Uji Aktivitas Penghambatan ABTS

Aktivitas penghambatan antioksidan dari senyawa turunan fenolat telah dilaporkan oleh Biskup dkk, 2013. Berdasarkan penelitian, uji aktivitas DPPH dilakukan pada beberapa senyawa turunan fenolat. Hasil dari uji antioksidan menunjukkan bahwa senyawa asam galat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih besar dibandingkan dengan pirogalol, asam gestisat, asam protokatekuat dan asam β-resorsilat. Senyawa asam galat (18) memiliki aktivitas penghambatan ABTS > pirogalol (23) > asam gestisat (24) > asam protokatekuat (25) > asam β-resorsilat (26) (Biskup dkk, 2013).



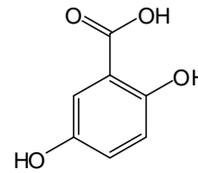
(18)

IC₅₀ 4,3 μM



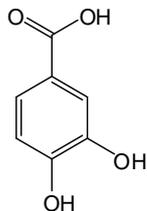
(23)

IC₅₀ 5,3 μM



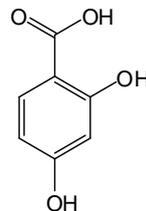
(24)

IC₅₀ 15,6 μM



(25)

IC₅₀ 20,7 μM



(26)

IC₅₀ 169,4 μM

BAB III

METODOLOGI

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, pipet kapiler, pipet tetes, spatula, pinset, bejana pengembang (*chamber*), maserator, peralatan kromatografi cair vakum, pelatan kromatografi kolom gravitasi, neraca analitik, lampu UV, *rotary vacuum evaporator*, Inersustain C18 (\varnothing 4,6 x 150 mm) untuk HPLC analitik, Inersustain C18 (\varnothing 25 x 250 mm) untuk HPLC preparatif, *vortex mixer*, mikropipet, *test tube*, tip, inkubator Eyla SLI-400, sentrifuge IEC 61010-2-020, *astec block incubator*, biosensor BF-5S, spektrofotometer UV Jasco V-530, spektrometer NMR JEOL 600 MHz ^1H -NMR dan 600 MHz ^{13}C -NMR.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari tumbuhan *S. polyanthum*, pelarut organik dan t eknis seperti *n*-heksana, diklorometana, kloroform, etil asetat, aseton, dan metanol. Silika gel 60 GF₂₅₄ untuk KKG (Wako Pure chemical Industries Ltd, Osaka, Japan), silika gel 60 GF₂₅₄ untuk KCV (Merck, Germany), plat KLT aluminium silika gel 60 GF₂₅₄, 20x20 cm (Merck, Germany), kertas saring, aluminium foil, pereaksi penampak noda serium sulfat ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$), pelarut metanol CD_3OD untuk NMR.

Bahan yang digunakan untuk uji α -glukosidase adalah enzim α -glukosidase (*Saccharomyces cerevisiae*), sukrosa, buffer HEPES, akarbosa aquades, DMSO, metanol. Sedangkan bahan untuk uji aldosa reduktase terdiri dari *Human recombinant aldose reductase* (HRAR), DL-gliseraldehid, β -NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), buffer sodium phosphate, kursetin. Bahan uji antioksidan terdiri dari DPPH (*2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate*), ABTS (*2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*), $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (*potassium peroxydisulfate*), metanol, etanol, trolox (*6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid*) sebagai standar antioksidan.

3.2 Prosedur Penelitian Isolasi Senyawa *S. polyanthum*

3.2.1 Persiapan Bahan

Sampel tumbuhan *S. polyanthum* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Probolinggo, Jawa Timur. Sampel tersebut dipotong menjadi bagian kecil yang kemudian dikeringkan dan dihaluskan sehingga dihasilkan serbuk kering yang siap untuk ekstraksi.

3.2.2 Uji Pendahuluan

Serbuk kering tumbuhan *S. polyanthum* masing-masing 2 gr dimasukkan ke dalam 4 buah vial, kemudian dimaserasi masing-masing dengan 10 ml pelarut yang berbeda yaitu *n*-heksana, metilen klorida, etil asetat, dan metanol selama 24 jam. Hasil ekstrak yang diperoleh kemudian dimonitoring dengan menggunakan eluen kloroform : metanol (9,5:0,5). Noda dideteksi menggunakan lampu UV kemudian disemprot menggunakan penampak noda (larutan 1,5 % CeSO₄ dalam H₂SO₄) dan dipanaskan diatas oven.

3.2.3. Uji Fitokimia

3.2.3.1 Uji Saponin

Ekstrak 0,5 m g dilarutkan dalam 2 ml air dan diaduk. Adanya saponin diketahui apabila terbentuk busa sabun selama sepuluh menit (Tiwari dkk, 2011).

3.2.3.2 Uji Tanin

Ekstrak 0,5 m g dalam tabung reaksi dipanaskan dalam 10 ml air dan disaring. Beberapa tetes ferric chloride 0,1 % ditambahkan ke dalam tabung dan diamati terbentuknya warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman (Rajendra dkk, 2011).

3.2.3.3 Uji Flavonoid

Ekstrak 0,5 m g dalam tabung reaksi dilarutkan dalam aseton. Beberapa tetes sodium hidroksida ditambahkan ke dalam tabung dan diamati terbentuknya larutan berwarna kuning (Tiwari dkk, 2011).

3.2.3.4 Uji Alkaloid

Test Mayer's ; Ekstrak 0,5 mg dalam tabung reaksi ditambahkan etanol yang mengandung 3 % asam tartarat kemudian diaduk. Filtrat yang dihasilkan diuji dengan reagen mayer. Terbentuknya endapan mengindikasikan adanya senyawa alkaloid (Aiyelaagble dkk, 2009).

3.2.3.5 Uji Triterpen

Test Salkowski's ; Ekstrak 0,5 mg dalam tabung reaksi dilarutkan dalam kloroform dan disaring. Beberapa tetes asam sulfat ditambahkan ke dalam tabung dan diaduk. Terbentuknya warna kuning keemasan mengindikasikan adanya senyawa triterpen (Tiwari dkk, 2011).

3.2.3.6 Uji Antrakuinon

Test Bornnager's ; ekstrak 0,5 m g dalam tabung ditambahkan 5 m L kloroform dan diaduk selama 5 menit. Ekstrak disaring dan filtrat yang dihasilkan ditambahkan larutan ammonia. Adanya senyawa antrakuinon dapat diamati pada lapisan ammonia yang berwarna pink violet atau merah (Aiyelaagble dkk, 2009).

3.2.3.7 Uji Karbohidrat

Test Benedict's ; ekstrak dilarutkan dalam 5 mL air destilasi dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan beberapa tetes reagen benedict dan dipanaskan. Terbentuknya endapan berwarna orange menunjukkan adanya gula pereduksi (Tiwari dkk, 2011).

3.2.4 Isolasi Senyawa *S. polyanthum*

Serbuk kering *S. polyanthum* 3,5 kg diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol 21 L selama 24 jam dan kemudian disaring. Ekstrak cair metanol yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak metanol pekat (245,2 g). Selanjutnya ekstrak pekat (196,5 g) dilarutkan dalam metanol : H₂O (2: 1) (3 L) kemudian dipartisi dengan pelarut *n*-heksana dan etil asetat. Fraksi cair dipekatkan dengan

rotary evaporator sehingga didapatkan fraksi *n*-heksana (73,34 g), fraksi etil asetat (47,58 g), dan fraksi aquous (47,56 g).

Fraksi etil asetat memiliki aktivitas yang sangat potensial, sehingga dilakukan proses pemisahan lebih lanjut. Fraksi etil asetat (40,16 g) dipisahkan dengan metode KCV menggunakan eluen *n*-heksana : EtOAc (100:0→20:80), EtOAc : MeOH (100:0→20:80) dan dimonitoring KLT sehingga diperoleh enam fraksi gabungan yaitu Ea.A-Ea.F. Selanjutnya fraksi Ea.D (2,025 g) dipisahkan dengan metode KKG menggunakan eluen *n*-heksana: CHCl₃ (80:20→0:100), CHCl₃ : MeOH (90:10→0:100) dan dimonitoring KLT sehingga diperoleh tujuh subfraksi gabungan yaitu Ea.D₁-Ea.D₇. Fraksi Ea.D₆ dimurnikan dengan preparatif RP-HPLC ODS menggunakan sistem isokratik H₂O : MeOH (50:50), UV detektor 220 nm, laju alir 5 mL/min dan volume injeksi 300 µL sehingga diperoleh senyawa Ea.D₆. Sedangkan fraksi Ea.D₅ dimurnikan dengan preparatif RP-HPLC ODS menggunakan eluen H₂O : MeOH (50:50 →30:70), UV detektor 220 nm, laju alir 5 mL/min dan volume injeksi 300 µL sehingga diperoleh delapan subfraksi yaitu Ea.D₅A-Ea.D₅H. Subfraksi Ea.D₅H diuji kemurniannya menggunakan HPLC analitik dengan eluen H₂O : MeOH (80:20 →30:70) dan diperoleh senyawa Ea.D₅H.

3.3 Pengujian dengan spektrometri

3.3.1 Spektroskopi NMR

Sampel murni diambil 8 -10 mg dan dilarutkan dalam 0,75 mL pelarut bebas proton yang melarutkan sampel dengan sempurna yaitu metanol (CD₃OD). Larutan sampel dimasukkan dalam tabung injeksi kemudian diletakkan dalam spektrometer NMR JEOL 600 MHz untuk mengukur ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

3.4 Uji Aktivitas Biologis dari *S. polyanthum*

3.4.1 Aktivitas Penghambatan α-Glukosidase

Aktivitas penghambatan α-glukosidase diuji menggunakan metode yang telah dilakukan oleh Ueeda dkk, (2005) dengan sedikit modifikasi. Pelarut yang sesuai (MeOH, DMSO, dan aquades) atau campuran dari ketiga pelarut diambil sebanyak 0,1 mL dan dimasukkan ke dalam 2 tabung (reaksi dengan sampel atau

tanpa sampel). Enzim α -glukosidase (5 unit/mL) sebanyak 0,1 mL dalam (0,15 M buffer HEPES) ditambahkan ke dalam 0,1 mL sukrose 0,1 M dalam (0,15 M buffer HEPES). Selanjutnya campuran reaksi tersebut diinkubasi pada 37 °C selama 30 menit. Setelah proses inkubasi, campuran reaksi dipanaskan pada 100 °C selama 10 menit untuk menghentikan reaksi. Pembentukan glukosa ditentukan dengan metode oksidasi glukosa menggunakan biosensor. Akarbosa digunakan sebagai kontrol positif. Aktivitas penghambatan α -glukosidase dapat dihitung sebagai berikut

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{C_{\text{kontrol}} - C_{\text{sampel}}}{C_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (1)$$

3.4.2 Aktivitas Penghambatan Aldosa Reduktase

Aktivitas penghambatan aldosa reduktase diuji secara spektrofotometri menggunakan spektrometer UV. Aktivitas *Human recombinant aldose reductase* (HRAR) diuji menurut prosedur yang telah dilakukan oleh Nishimura dkk, (1991) dengan sedikit modifikasi. Campuran reaksi dibuat dari 500 μ L buffer sodium phospat (pH 6,2) yang ditambahkan 100 μ L larutan sampel uji dalam DMSO, 100 μ L DL-gliseraldehid 10 mM, 195 μ L aquades, 100 μ L β -NADPH 0,15 mM. Selanjutnya campuran tersebut *divortex mixer* dan diinkubasi pada 25 °C selama 5 menit. Kemudian campuran tersebut ditambahkan 5 μ L enzim aldosa reduktase. Aktivitas penghambatan aldosa reduktase ditentukan dengan mengukur penurunan absorbansi pada 340 nm selama 10 menit menggunakan spektrofotometer UV. Kuersetin digunakan sebagai kontrol positif, kontrol negatif adalah uji tanpa sampel. Aktivitas penghambatan aldosa reduktase dapat dihitung sebagai berikut

$$\% \text{ Inhibisi} = [1 - (\Delta A \text{ sampel/menit} - \Delta A \text{ kontrol/menit}) \times 100 \% \quad (2)$$

ΔA sampel/menit = reduksi penyerapan selama 1 menit dengan penambahan sampel, dan ΔA kontrol/menit = reduksi penyerapan selama 1 menit dengan penambahan DMSO.

3.4.3 Aktivitas Penghambatan DPPH

Aktivitas antioksidan diuji berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Dudonne dkk, (2009) dengan sedikit modifikasi. Sampel uji (10 mg) dilarutkan dalam 1 mL metanol. Campuran reaksi terdiri dari 1 mL larutan DPPH 6×10^{-5} M dan 33 μ L larutan sampel dalam metanol. Setelah 20 menit inkubasi pada 37 °C, absorbansi dari campuran reaksi diukur pada panjang gelombang 515 nm menggunakan spektrofotometer (UV Jasco V-530) dan diperoleh nilai absorbansi sampel (A_s). Sampel blanko terdiri dari 33 μ L metanol dalam larutan DPPH diukur pada panjang gelombang yang sama. Uji antioksidan dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{blanko}}} \times 100 \quad (3)$$

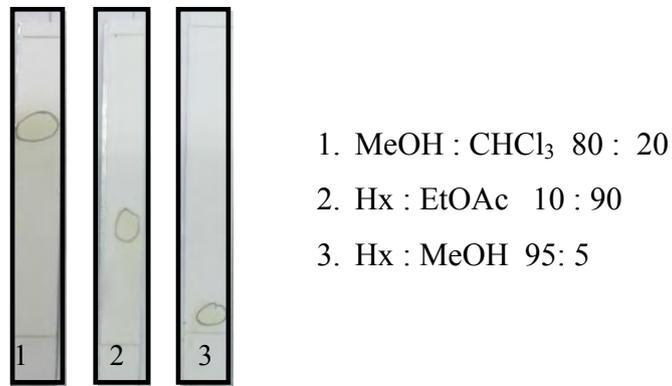
3.4.4 Aktivitas Penghambatan ABTS

Aktivitas ABTS diuji menurut metode yang telah dilakukan oleh Pellegrini dkk, (1999). Larutan ABTS dibuat dari 5 mL ABTS 7 mM dan 88 μ L potasium perokdisulfat ($K_2S_2O_8$). Hasil dari campuran didiamkan pada suhu kamar selama 12-16 jam sehingga dihasilkan larutan biru tua. Campuran tersebut ditambahkan dengan 99,5 % ethanol untuk memperoleh absorbansi $0,7 \pm 0,02$ pada panjang gelombang 734 nm. Sampel uji (10 mg) dilarutkan dalam 1 mL DMSO. Campuran reaksi terdiri dari 1 mL larutan ABTS dan 10 μ L larutan sampel uji yang kemudian diaduk selama 10 detik. Setelah 4 menit inkubasi pada 30 °C, absorbansi dari campuran reaksi diukur pada panjang gelombang 734 nm menggunakan spektrofotometer (UV Jasco V-530) dan diperoleh nilai absorbansi sampel (A_s). Etanol 99,5 % digunakan sebagai blanko dan diukur pada panjang gelombang yang sama (A_b). Uji antioksidan dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus (3).

3.4.5 Analisis Statistika

Semua aktivitas biologis dilakukan tiga kali pengulangan dan hasil analisis statistika dengan menggunakan standar deviasi (\pm SD).

menunjukkan noda tunggal sehingga dapat dikatakan sebagai senyawa murni dan selanjutnya disebut senyawa Ea.D₆.



Gambar 4.22 Kromatogram hasil uji tiga eluen yang berbeda kepolaran terhadap kristal Ea.D₆

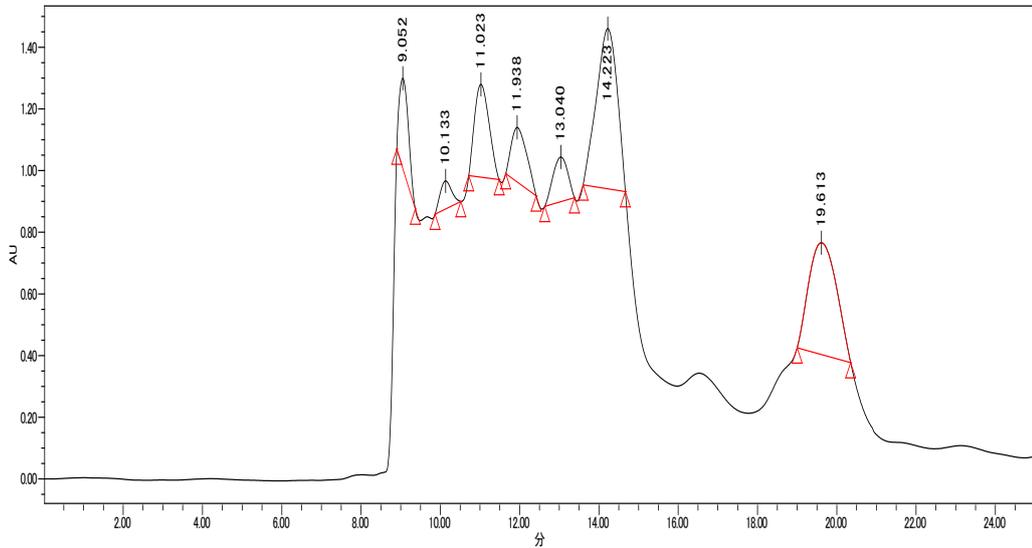
Hasil monitoring KLT senyawa Ea.D₆ memiliki R_f yang sama dengan senyawa 3,4,5-trihidroksi asam benzoat standar. Berikut adalah hasil monitoring KLT perbandingan Ea.D₆ dengan senyawa 3,4,5-trihidroksi asam benzoat. (Gambar 4.23). Maka dugaan sementara untuk struktur senyawa Ea.D₆ adalah 3,4,5-trihidroksi asam benzoat.



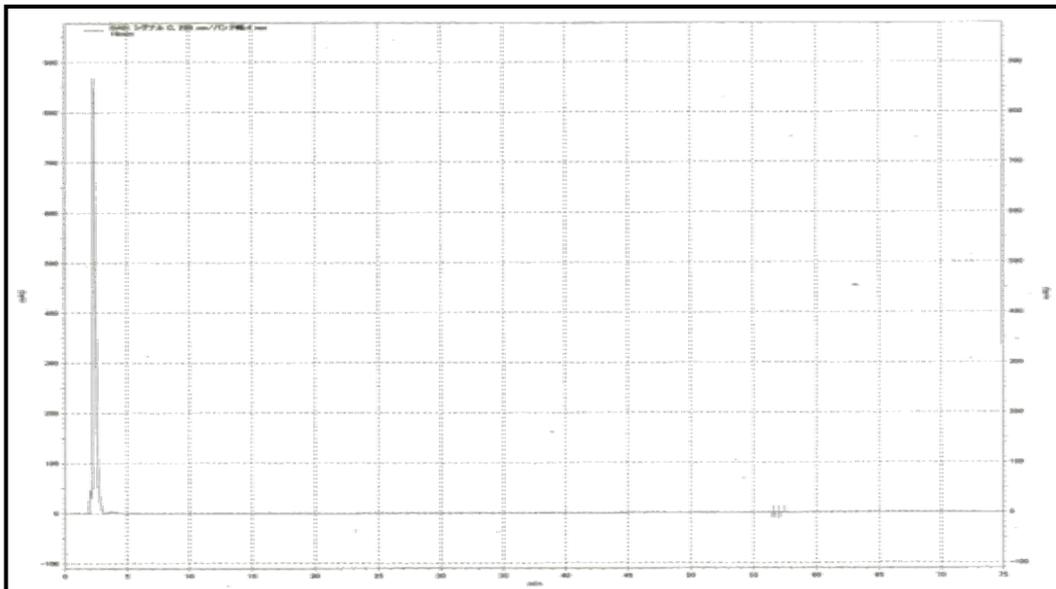
Gambar 4.23 Hasil monitoring KLT senyawa Ea.D₆ dengan senyawa 3,4,5-trihidroksi asam benzoat.

Fraksi Ea.D₅ sebanyak 0,239 g seperti pada Gambar 4.24, menunjukkan adanya beberapa puncak dimana fraksi tersebut belum murni. Sehingga fraksi Ea.D₅ dimurnikan lebih lanjut menggunakan preparatif HPLC dengan campuran

eluen H₂O : MeOH (50:50 → 30:70) dan diperoleh 8 subfraksi (Ea.D_{5a} - Ea.D_{5h}). Hasil subfraksi Ea.D_{5h} yang diperoleh diuji kemurniaannya menggunakan HPLC analitik dengan eluen H₂O : MeOH (80:20 → 30:70) seperti pada Gambar 4.25.



Gambar 4.24 Kromatogram HPLC fraksi Ea.D₅ menggunakan eluen H₂O : MeOH (50:50 → 30:70).



Gambar 4.25 Kromatogram HPLC analitik fraksi Ea.D_{5H} menggunakan eluen H₂O : MeOH (80:20 → 30:70).

Berdasarkan hasil HPLC analitik subfraksi Ea.D₅H seperti pada Gambar 4.25 menunjukkan adanya puncak tunggal pada waktu retensi 3,02 menit, sehingga dapat dikatakan sebagai senyawa murni dan selanjutnya disebut senyawa Ea.D₅H. Senyawa ini diperoleh dalam bentuk pasta oil berwarna orange sebanyak 14 mg.

4.4 Penentuan Struktur

4.4.1 Penentuan Struktur Senyawa Ea.D₆

Senyawa Ea.D₆ yang berbentuk padatan berwarna putih dilakukan identifikasi struktur menggunakan spektroskopi ¹H dan ¹³C NMR. Penentuan struktur menggunakan data spektrum ¹H-NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) senyawa Ea.D₆ menunjukkan adanya satu sinyal proton singlet pada pergeseran kimia δ_H (ppm) 7.06 (2H, s). Sinyal tersebut merupakan sinyal yang khas untuk proton aromatik.

Pada spektrum ¹H- NMR pelarut CD₃OD menunjukkan adanya sinyal yang khas pada pergeseran kimia δ_H (ppm) 3.31. Sinyal lain pada pergeseran kimia δ_H (ppm) 4.86 (4H, s) menunjukkan adanya sinyal untuk proton hidroksi. Berdasarkan data ¹H- NMR, maka diperoleh kesimpulan sementara bahwa senyawa Ea.D₆ memiliki proton aromatik dan proton hidroksi. Sehingga dapat disarankan bahwa senyawa Ea.D₆ termasuk golongan senyawa aromatik yang tersubstitusi oleh gugus hidroksi dan memiliki kerangka dasar fenol.

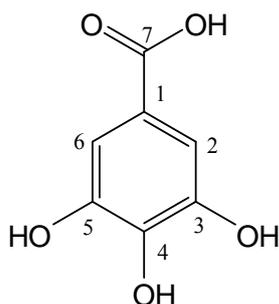
Pengukuran lebih lanjut yaitu dengan spektrum ¹³C- NMR seperti yang terlihat pada Tabel 4.3. Pada spektrum ¹³C-NMR senyawa Ea.D₆ menunjukkan adanya beberapa kelompok sinyal yang terdiri dari lima sinyal karbon pada pergeseran kimia δ_C (ppm) 110.4 ; 122.1 ; 139.6 ; 146.4 ; dan 170.5. Berdasarkan integrasinya, sinyal karbon pada pergeseran kimia δ_C (ppm) 110.4 dan 146.4 memiliki masing-masing dua karbon dengan lingkungan yang sama. Pergeseran kimia δ_C (ppm) 110.4 memberikan informasi adanya C-metin pada posisi C-2 dan C-6. Sinyal pada δ_C (ppm) 146.4 menunjukkan adanya gugus khas C-kuarterner yang berikatan dengan hidroksi pada posisi C-3 dan C-5. Pergeseran kimia δ_C (ppm) 170.5 memberikan informasi adanya gugus karboksilat pada posisi C-7 dan

δ_C (ppm) 122.1 dan 139.6 menunjukkan adanya gugus C-kuarternar pada posisi C-1 dan C-4.

Tabel 4.3 Data ^1H - NMR dan ^{13}C - NMR senyawa Ea.D₆(pelarut CD₃OD)

Nomor karbon	Senyawa Ea.D ₆	
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	-	122.1
2	7.06	110.4
3	-	146.4
4	-	139.6
5	-	146.4
6	7.06	110.4
7	-	170.5

Berdasarkan data analisis ^1H dan ^{13}C - NMR, dapat diperoleh kesimpulan bahwa senyawa Ea.D₆ merupakan turunan dari senyawa aromatik yaitu golongan senyawa fenol dengansubstitusi gugus hidroksi dan karboksilat. Selanjutnya data pergeseran kimia pada senyawa Ea.D₆ dibandingkan dengan data literatur yang telah dilaporkan sebelumnya dari daun *Terminalia nigrovenulosas* oleh (Nguyen dkk, 2013). Secara kemotaksonomi afinitas kimiawi dalam satu spesies dengan spesies lain dalam satu famili atau genus pada prinsipnya sama secara kualitatif. Hal ini ditunjukkan dengan isolasi senyawa Ea.D₆ dari fraksi etil asetat *Syzygium forrestii* Merr (Tian dkk, 2011). Dengan demikian disimpulkan bahwa Ea.D₆ merupakan senyawa 3,4,5-trihidroksi asam benzoat seperti pada Gambar 4.26.



Gambar 4.26 Struktur senyawa Ea.D₆ (3,4,5-trihidroksi asam benzoat)

4.4.2. Penentuan Struktur Senyawa Ea.D₅H

Senyawa Ea.D₅H yang berbentuk pasta oil berwarna orange dilakukan identifikasi struktur menggunakan spektroskopi ¹H dan ¹³C NMR. Penentuan struktur menggunakan data spektrum ¹H-NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) senyawa Ea.D₅H menunjukkan adanya beberapa sinyal proton yaitu sinyal proton aromatik, metoksi, metilen dan hidroksi. Sinyal pada pergeseran kimia δ_H (ppm) 3.87 (3H, s) dan 3.83 (3H, s) menunjukkan adanya sinyal untuk proton metoksi. Sinyal pada pergeseran δ_H (ppm) 6.82 (1H, dd, $J=8.2$, 1.8 Hz), 6.77 (1H, d, $J=8.2$ Hz) dan 6.94 (1H, d, $J=1.8$ Hz) menunjukkan adanya proton aromatik dengan sistem ABX. Sinyal pada pergeseran δ_H (ppm) 6.67 (1H, s) menunjukkan adanya sinyal proton aromatik. Sinyal khas lainnya yaitu adanya sinyal proton oksimetin pada pergeseran δ_H (ppm) 5.49 (1H, d, $J=6$ Hz). Pergeseran kimia δ_H (ppm) 3.85 (1H, m) menunjukkan adanya sinyal proton metin dan δ_H (ppm) 1.84 (2H, m), 2.64 (2H, t, $J=7.2$ Hz), 3.86 (2H, t, $J=6$ Hz) menunjukkan adanya sinyal proton metilen. Berdasarkan data ¹H-NMR, maka diperoleh kesimpulan sementara bahwa senyawa Ea.D₅H memiliki proton aromatik, proton metin, metilen serta proton metoksi. Sehingga dapat disarankan bahwa senyawa Ea.D₅H tergolong senyawa aromatik yang tersubsitusi oleh gugus metoksi dan hidroksi metil.

Pengukuran lebih lanjut yaitu dengan spektrum ¹³C-NMR seperti yang terlihat pada Tabel 4.4. Pada spektrum ¹³C-NMR senyawa Ea.D₅H memiliki 20 atom karbon yang menghasilkan spektrum pada pergeseran δ_C (ppm) 32.9 ; 35.8 ; 55.5 ; 56.4 ; 56.8 ; 62.3 ; 65.1 ; 89.0 ; 110.6 ; 114.2 ; 116.2 ; 118.0 ; 119.8 ; 129.9 ; 134.9 ; 136.9 ; 145.2 ; 147.5 ; 147.6 dan 149.1. Berdasarkan data spektrum ¹³C-NMR, dapat diperoleh informasi adanya gugus fungsi metoksi pada

pergeseran kimia δ_C (ppm) 56.8 dan 56.4. Sinyal khas pada pergeseran kimia δ_C (ppm) 89.0 menunjukkan adanya oksidasi karbon cincin furan. Pergeseran kimia δ_C (ppm) 65.0 dan 62.3 menunjukkan adanya gugus CH_2OH . Berdasarkan data spektrum ^{13}C -NMR, dapat diperoleh informasi adanya gugus metin pada pergeseran kimia δ_C (ppm) 55.5 ; 119.8 ; 118.0 ; 116.2 ; 114.2 ; 110.6. Selain itu adanya gugus C-kuarterner terdapat pada pergeseran kimia δ_C (ppm) 129.9 ; 134.9 ; 145.2 ; 147.5 ; 147.6; dan 149.1. Selain itu adanya gugus metilen terdapat pada pergeseran kimia δ_C (ppm) 32.9 dan 35.8.

Berdasarkan uraian analisis di atas dapat disimpulkan sementara bahwa senyawa Ea.D₅H merupakan turunan senyawa aromatik yang strukturnya memiliki 1 kerangka aromatik sistem ABX, 1 kerangka aromatik lain, 1 kerangka dasar benzofuran yang sangat khas dengan pergeseran kimia δ_C (ppm) 89.0. Selain itu pergeseran kimia yang khas δ_C (ppm) 65.0 dan 62.3 menunjukkan adanya dua gugus CH_2OH dan juga adanya dua gugus metoksi pada δ_C (ppm) 56.8 dan 56.4.

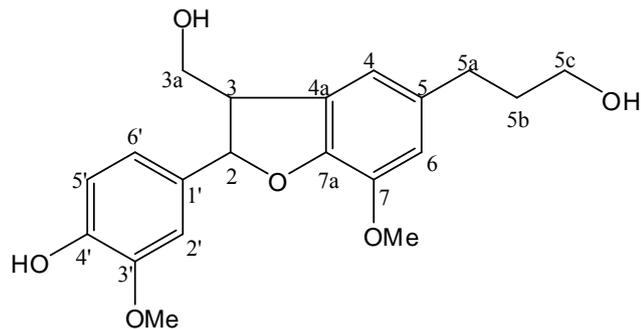
Penentuan struktur senyawa Ea.D₅H dengan menggunakan data ^1H dan ^{13}C NMR belum dapat digunakan untuk mengetahui struktur senyawa, sehingga data lain yang mendukung sangat diperlukan. Data yang dapat digunakan adalah literatur mengenai pergeseran kimia senyawa-senyawa hasil isolasi dari famili atau genus yang sama dengan *S. polyanthum*. Hal ini karena secara kemotaksonomi afinitas kimiawi dalam satu spesies dengan spesies lainnya dalam satu famili atau genus pada prinsipnya sama secara kualitatif, perbedaannya hanya terdapat pada kuantitas.

Beberapa hasil penelitian terdahulu mengenai pergeseran kimia senyawa-senyawa hasil isolasi dari *S. polyanthum* tidak ada yang menunjukkan kesamaan dengan senyawa Ea.D₅H. Sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa Ea.D₅H belum pernah diisolasi sebelumnya dari *S. polyanthum*. Namun hasil penelitian Tian dkk, (2011) menginformasikan bahwa senyawa isolasi resinol dari *S. forrestii* Merr telah diisolasi dan memiliki keterkaitan struktur dengan senyawa Ea.D₅H. Senyawa tersebut merupakan senyawa lignan dan senyawa turunan lignan yang telah diisolasi dari daun *Glochidion zebylanicum* (Otsuka dkk, 2000) dan *Canadian Maple Sap* (Yoshikawa dkk, 2013). Senyawa ini memiliki kesamaan pergeseran kimia ^1H dan ^{13}C NMR dengan senyawa Ea.D₅H. Senyawa

tersebut adalah senyawa 2,3-dihidro-2-(4-hidroksi-3-metoksi-fenil)-3-(hidroksimetil)-7-metoksi-5-benzofuranpropanol yang memiliki kesamaan struktur dengan senyawa Ea.D₅H. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa Ea.D₅H. merupakan senyawa 2,3-dihidro-2-(4-hidroksi-3-metoksi-fenil)-3-(hidroksimetil) -7-metoksi-5-benzofuranpropanol seperti pada Gambar 4.27. Senyawa Ea.D₅H. merupakan senyawa turunan lignan yang pertama kali diisolasi dari *S. polyanthum*. Penentuan penghambatan α -glukosidase dan aldosa reduktase akan dilakukan pada penelitian selanjutnya.

Tabel 4.4 Data ¹H-NMR dan ¹³C-NMR senyawa Ea.D₅H (CD₃OD)

Nomor karbon	Senyawa Ea.D ₅ H	
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	5.49 (1H, d, $J= 6$ Hz)	89.0
3	3.85 (1H, m)	55.5
3a	3.47 (1H, dd, $J= 7 ; 11$ Hz) 3.76 (1H, dd, $J= 7 ; 11$ Hz)	65.1
4a	-	129.9
4	6.67 (1H, s)	118.0
5	-	136.9
5a	2.64 (2H, t, $J= 7.2$ Hz)	32.9
5b	1.84 (2H, m)	35.8
5c	3.86 (2H, t, $J=6$ Hz)	62.3
6	6.67 (1H, s)	114.2
7	-	145.2
7a	-	147.5
1'	-	134.9
2'	6.94 (1H, d, $J= 2$ Hz)	110.6
3'	-	147.6
4'	-	149.1
5'	6.77 (1H, d, $J= 8$ Hz)	116.2
6'	6.82(1H, d, $J= 8 ; 2$ Hz)	119.7
7-OMe	3.87 (3H, s)	56.4
3'-OMe	3.83 (3H, s)	56.8



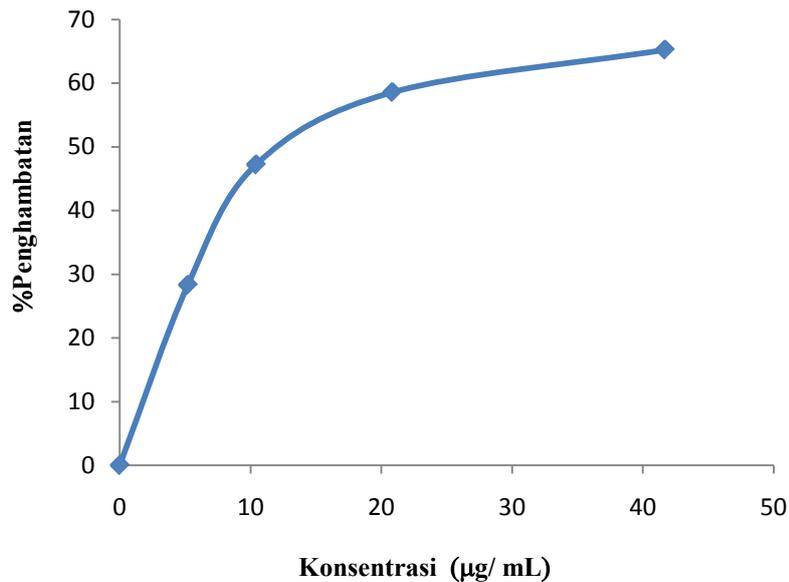
Gambar 4.27 Struktur senyawa Ea.D₅H 2,3-dihidro-2-(4-hidroksi-3-metoksi-fenil)-3- (hidroksilmetil)-7-metoksi-5-benzofuranpropanol.

4.5 Aktivitas Biologis Senyawa Isolasi

4.5.1. Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase

Senyawa uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ea.D₆ dengan beberapa variasi konsentrasi. Pengujian aktivitas α -glukosidase secara *in-vitro* dilakukan dengan penambahan sampel uji dan enzim α -glukosidase 100 μ L ke dalam tabung yang berisi 100 μ L larutan sukrose. Selanjutnya campuran reaksi divortex \pm 1 menit yang bertujuan untuk menghomogenkan enzim α -glukosidase dengan sampel uji. Kemudian campuran reaksi tersebut diinkubasi pada 37 °C selama 30 m enit. Setelah inkubasi, campuran reaksi dipanaskan pada 100 °C selama 10 menit untuk menghentikan reaksi.

Hasil uji aktivitas α -glukosidase terhadap senyawa Ea.D₆ dengan variasi konsentrasi dapat dilihat pada kurva persen penghambatan (Gambar 4.28). Berdasarkan kurva penghambatan tersebut, diperoleh nilai IC₅₀ senyawa Ea.D₆ sebesar 14,88 μ g/mL dan nilai IC₅₀ akarbosa sebesar 102,77 μ g/mL. Nilai IC₅₀ tersebut menunjukkan bahwa senyawa Ea.D₆ memiliki kemampuan yang lebih besar dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase dibandingkan dengan akarbosa sebagai kontrol positif.



Gambar 4.28 Aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase senyawa Ea.D₆

Hipotesa penelitian ini menyatakan bahwa senyawa yang dapat dijadikan sebagai inhibitor α -glukosidase adalah senyawa yang memiliki kemiripan struktur dengan substrat yaitu adanya gugus glikosida. Namun pada penelitian ini, senyawa yang berhasil diisolasi adalah senyawa fenolat aglikon. Senyawa Ea.D₆ diprediksi memiliki kemampuan penghambatan yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan akarbosa sebagai kontrol positif. Berdasarkan uji aktivitas α -glukosidase, senyawa Ea.D₆ memiliki kemampuan yang lebih besar dalam menghambat aktivitas enzim. Adapun faktor yang mempengaruhi aktivitas dari senyawa tersebut adalah adanya gugus hidroksi yang memiliki kemampuan untuk membentuk ikatan hidrogen dengan residu asam. Ikatan hidrogen adalah suatu ikatan antara atom H yang mempunyai muatan positif parsial dengan atom lain yang bersifat elektronegatif dan mempunyai sepasang elektron bebas dengan oktet lengkap seperti O, N, dan F (Siswandono dkk, 2011). Pada kondisi ini atom H dari gugus hidroksi akan berinteraksi dengan atom O dari Glu322, Asp325 dan atom N dari Lys324.

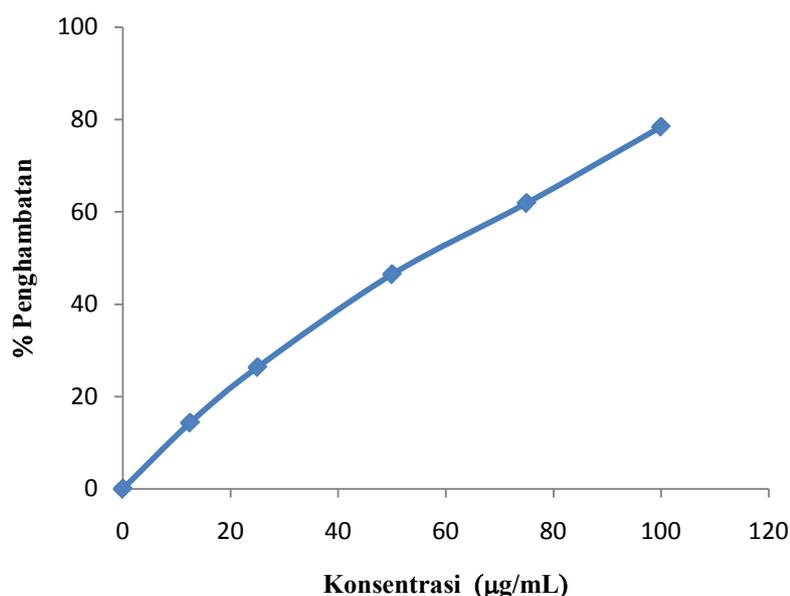
Adanya gugus karboksilat pada struktur senyawa Ea.D₆ memiliki pengaruh terhadap aktivitas penghambatan α -glukosidase. Gugus karboksilat memiliki kemampuan untuk membentuk ikatan ion dengan gugus reseptor protein. Ikatan ion adalah ikatan yang dihasilkan oleh daya tarik menarik elektrostatis

antara ion-ion yang muatannya berlawanan. Suatu senyawa yang memiliki gugus kation seperti R_3NH^+ , R_4N^+ dan $R_2C=NH_2^+$, dan gugus anion seperti $RCOO^-$, RSO_3^- dan $RCOS^-$ dapat membentuk ikatan ion dengan gugus protein yang bermuatan berlawanan. Gugus kation protein berupa gugus asam amino seperti lisin, glutamin, asparagin, arginin, glisin dan histidin. Sedangkan gugus anion protein berupa gugus asam amino seperti asam aspartat, glutamat, sistein dan metionin (Siswandono dkk, 2011). Pada kondisi ini gugus anion $RCOO^-$ dari struktur senyawa Ea.D₆ akan membentuk ikatan ion dengan gugus protein Glu322, Asp325 dan Asp521. Hyun dkk, 2014 melaporkan bahwa aktivitas penghambatan α -glukosidase dari senyawa turunan flavonoid dan fenolat dapat diketahui melalui analisis *docking*. Senyawa kuersetin memiliki nilai $IC_{50} = 1,0 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ > mirisetin = $3,2 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ > rutin = $84,1 \pm 4,1 \mu\text{g/mL}$ > akarbosa = $140,5 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$.

4.5.2. Aktivitas Penghambatan Aldosa Reduktase

Senyawa uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa Ea.D₆ dengan lima variasi konsentrasi, masing-masing 100, 75, 25, dan 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Pengujian aktivitas aldosa reduktase secara *in-vitro* dilakukan dengan penambahan larutan sampel uji 100 μL ke dalam campuran reaksi yang terdiri dari DL-gliseraldehid dan β -NADPH. Selanjutnya campuran reaksi *divortex* \pm 1 menit yang bertujuan untuk menghomogenkan sampel uji dengan substrat. Kemudian campuran reaksi tersebut diinkubasi pada 25 °C selama 5 menit. Uji aktivitas dimulai dengan penambahan enzim aldosa reduktase sebanyak 5 μL ke dalam campuran yang telah diinkubasi.

Hasil uji aktivitas aldosa reduktase terhadap senyawa Ea.D₆ dengan variasi konsentrasi dapat dilihat pada kurva persen penghambatan (Gambar 4.29). Berdasarkan kurva penghambatan tersebut, diperoleh nilai IC_{50} senyawa Ea.D₆ sebesar 47,30 $\mu\text{g/mL}$ dan nilai IC_{50} untuk kuersetin sebesar 1,50 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} menunjukkan bahwa senyawa Ea.D₆ memiliki kemampuan yang lebih kecil dalam menghambat aktivitas enzim aldosa reduktase dibandingkan dengan kuersetin sebagai kontrol positif.



Gambar 4.29 Aktivitas penghambatan enzim aldosa reduktase senyawa Ea.D₆

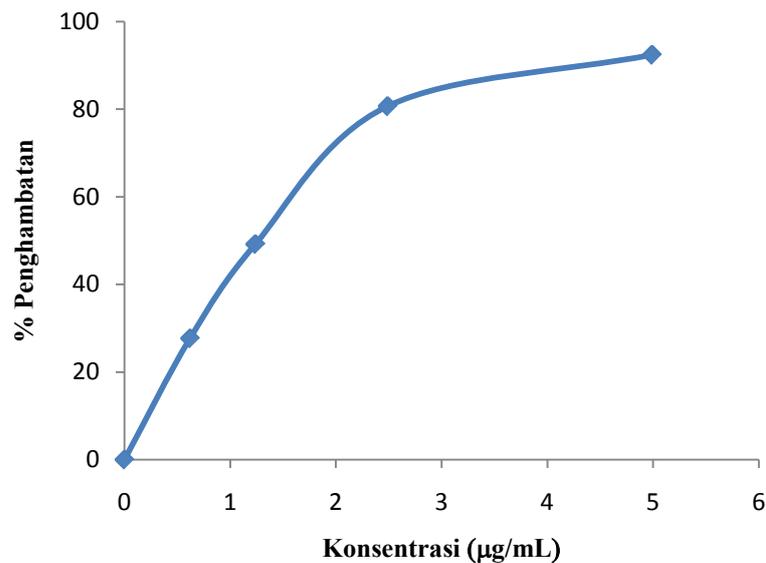
Senyawa polifenol merupakan senyawa yang terdiri dari satu atau lebih cincin aromatik dengan gugus hidroksi pada posisi yang berlainan. Senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas penghambatan yang signifikan dalam menghambat radikal bebas. Selain sebagai antioksidan, senyawa polifenol dapat menghambat aktivitas enzim aldosa reduktase dengan mencegah konversi gliseraldehid menjadi gliserol dan glukosa menjadi sorbitol yang ditandai dengan menurunnya konsentrasi NADPH (Chethan dkk, 2008).

Kuersetin merupakan inhibitor yang paling berperan dalam penghambatan aldosa reduktase dibandingkan senyawa polifenol lainnya. Aktivitas dari senyawa kuersetin berkorelasi dengan potensi antioksidan, dimana senyawa tersebut memiliki proton yang dapat berperan dalam penghambatan aldosa reduktase. Senyawa kuersetin bekerja sebagai inhibitor non kompetitif yang berikatan dengan enzim secara bebas atau dekat sisi aktif enzim. Kekuatan hidrogen dari gugus hidroksi senyawa kuersetin akan menentukan kemampuan senyawa tersebut untuk berikatan dengan protein aldosa reduktase yaitu histidin 110 dan tirosin 48 yang merupakan kunci utama dalam penghambatan aldosa reduktase (Chethan dkk, 2008).

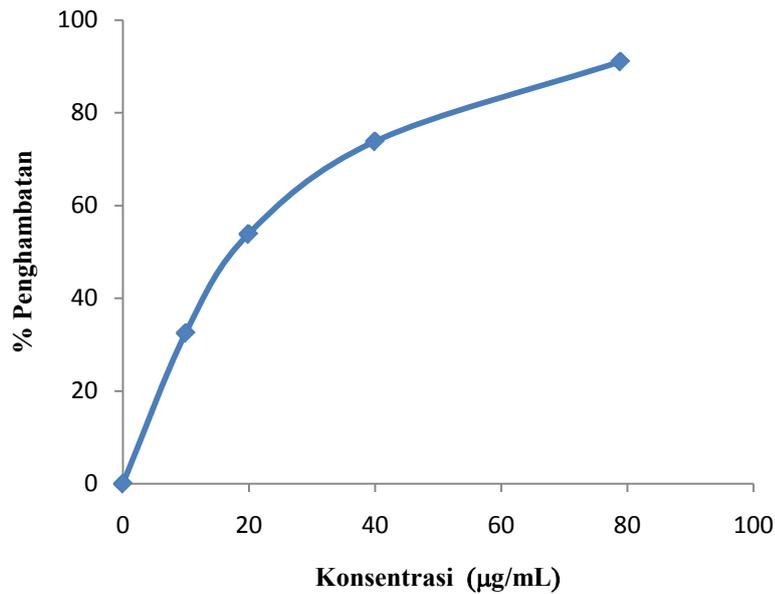
Senyawa Ea.D₆ menunjukkan adanya penghambatan aldosa reduktase yang lebih lemah dibandingkan kuersetin. Hal ini dikarenakan adanya pengaruh gugus tetangga pada gugus hidroksi senyawa Ea.D₆ (Chethan dkk, 2008). Berdasarkan penelitian oleh Chethan dkk, 2008 m elaporkan bahwa senyawa 3,4,5-trihidroksi asam benzoat dan kuersetin memiliki nilai IC₅₀ sebesar 97,3 ± 2,5 µg/ml dan 25,23± 2,2 µg/ml.

4.5.3. Aktivitas Penghambatan DPPH

Pengujian aktivitas DPPH secara *in-vitro* dilakukan dengan menambahkan larutan sampel uji ke dalam tabung yang berisi larutan DPPH. Campuran reaksi tersebut diinkubasi pada 37 °C selama 20 menit. Selanjutnya perubahan warna yang terjadi diukur pada panjang gelombang 515 nm . Hasil uji aktivitas penghambatan DPPH terhadap senyawa Ea.D₆ dan senyawa Ea.D₅H dapat dilihat pada kurva penghambatan seperti pada Gambar 4.30 dan Gambar 4.31.



Gambar 4.30. Aktivitas penghambatan DPPH senyawa Ea.D₆



Gambar 4.31 Aktivitas penghambatan DPPH senyawa Ea.D₅H

Berdasarkan kurva penghambatan tersebut, senyawa Ea.D₆ memiliki nilai IC₅₀ sebesar $1,19 \pm 1,96 \mu\text{g/mL}$, senyawa Ea.D₅H memiliki nilai IC₅₀ sebesar $17,88 \pm 0,81 \mu\text{g/mL}$ dan trolox sebagai kontrol positif memiliki nilai IC₅₀ sebesar $3,09 \pm 0,88 \mu\text{g/mL}$.

Senyawa fenolat merupakan senyawa yang terdiri dari satu cincin aromatik dengan adanya gugus hidroksi pada posisi yang berlainan. Senyawa fenolat diklasifikasikan kedalam fenol sederhana yang terdiri dari cincin aromatik dengan satu gugus hidroksi, polifenol dengan dua subunit fenol, atau tanin dengan tiga atau lebih subunit fenol (Sultana dkk, 2007). Aktivitas antioksidan dari senyawa fenolat memiliki korelasi dengan struktur kimia dari senyawa tersebut. Semakin besarnya jumlah gugus hidroksi pada senyawa fenolat akan menyebabkan aktivitas antioksidan semakin besar (Lelono dkk, 2013).

Aktivitas antioksidan dari senyawa Ea.D₆ dan turunannya juga dilaporkan oleh Zhongbing dkk, 2006. Berdasarkan penelitian tersebut dapat diambil kesimpulan bahwa senyawa Ea.D₆ memiliki aktivitas yang jauh lebih besar dibandingkan turunannya seperti senyawa (19), (21), dan (22). Adanya gugus hidroksi memiliki peranan yang sangat penting untuk menentukan efisiensi senyawa dalam penghambatan radikal bebas. Gugus hidroksi tersebut digunakan

sebagai donor proton yang akan berinteraksi dengan elektron yang tidak berpasangan dari DPPH sehingga membentuk senyawa yang lebih stabil. Interaksi tersebut menyebabkan perubahan warna serapan dari ungu menjadi kuning pada panjang gelombang 515 nm (Zurowska dkk, 2012).

Berdasarkan penelitian tersebut, adanya gugus hidroksi pada posisi para dan adanya gugus karboksilat dapat meningkatkan aktivitas penghambatan. Senyawa metil galat dan propil galat memiliki jumlah dan posisi hidroksi yang sama dengan senyawa Ea.D₆, namun aktivitas antioksidan dari kedua senyawa ini sangat berbeda. Hal ini dikarenakan adanya ikatan ester yang mempengaruhi aktivitas antioksidan. Semakin panjang ikatan ester maka aktivitas antioksidan semakin kecil (Zhongbing dkk, 2006).

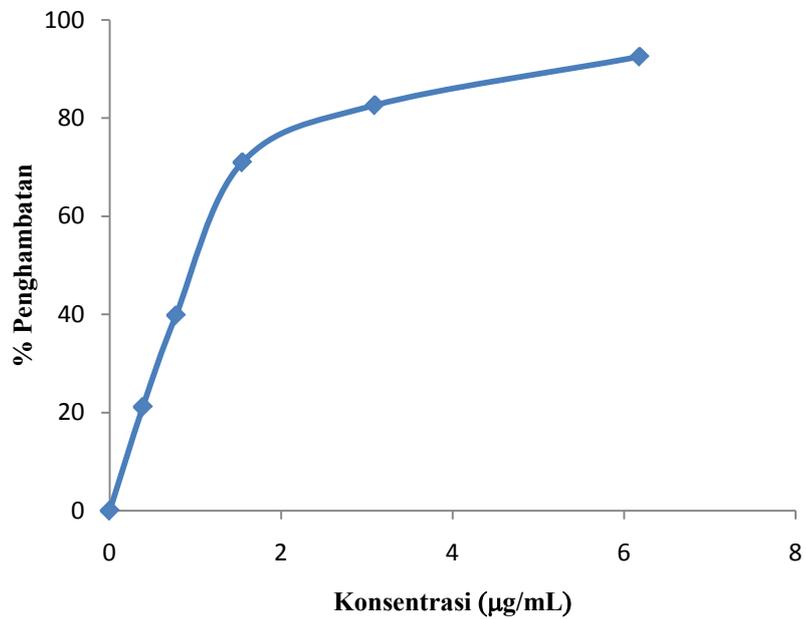
Trolox merupakan senyawa turunan vitamin E yang memiliki sifat antioksidan. Senyawa ini biasanya digunakan sebagai standar atau kontrol positif dalam uji antioksidan (Cos dkk, 2003). Hasil uji aktivitas antioksidan untuk senyawa ini sebesar $3,09 \pm 0,88$ $\mu\text{g/mL}$. Aktivitas antioksidan trolox lebih kecil dibandingkan dengan senyawa Ea.D₆ karena senyawa trolox hanya memiliki satu gugus hidroksi, sedangkan senyawa Ea.D₆ memiliki tiga gugus hidroksi.

Senyawa Ea.D₅H merupakan senyawa turunan lignan yang memiliki penghambatan DPPH yang lebih kecil dibandingkan senyawa Ea.D₆ dan trolox. Berdasarkan strukturnya, kedua senyawa tersebut memiliki kesamaan adanya gugus hidroksi dalam cincin aromatik serta adanya gugus karboksilat yang berperan dalam penghambatan. Sedangkan pada senyawa Ea.D₅H memiliki gugus hidroksi yang terikat cincin aromatik, namun tidak adanya gugus karboksilat dalam struktur senyawa. Hal ini yang mengakibatkan senyawa Ea.D₅H memiliki aktivitas yang lebih kecil dibandingkan senyawa lainnya.

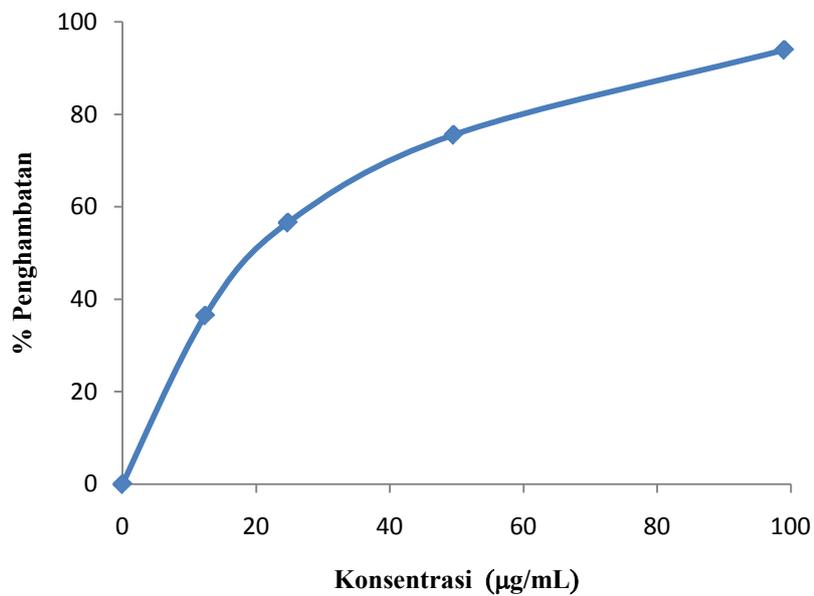
4.5.4. Aktivitas Penghambatan ABTS

Pengujian aktivitas ABTS secara *in-vitro* dilakukan dengan menambahkan larutan sampel uji ke dalam tabung yang berisi larutan ABTS. Campuran reaksi tersebut diinkubasi pada 30 °C selama 4 menit. Selanjutnya perubahan warna yang terjadi diukur pada panjang gelombang 734 nm. Hasil uji aktivitas ABTS

terhadap senyawa Ea.D₆ dapat dilihat pada kurva inhibisi seperti pada Gambar 4.32 dan senyawa Ea.D₅H seperti pada Gambar 4.33.



Gambar 4.32. Aktivitas penghambatan ABTS senyawa Ea.D₆



Gambar 4.33. Aktivitas penghambatan ABTS senyawa Ea.D₅H

Berdasarkan kurva penghambatan tersebut, senyawa Ea.D₆ memiliki nilai IC₅₀ sebesar 1,00 ± 2,20 µg/mL, senyawa Ea.D₅H memiliki nilai IC₅₀ sebesar 19,86 ± 1,96 µg/mL dan trolox sebagai kontrol positif memiliki nilai IC₅₀ sebesar 4,11 ± 1,36 µg/mL.

Aktivitas antioksidan alam bergantung pada struktur kimia yang dimiliki oleh suatu senyawa. Senyawa yang memiliki jumlah dan posisi gugus hidroksil serta tipe substituen yang berikatan pada cincin aromatik berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan. Senyawa antioksidan terbesar pada metode ABTS diperoleh dari golongan senyawa fenolat dengan substitusi tiga gugus hidroksi (Biskup dkk, 2012). Adanya gugus hidroksi berperan dalam netralisasi senyawa radikal melalui transfer elektron dari atom hidrogen. ABTS(2,2'-azinobis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) merupakan radikal kation yang sangat reaktif terhadap antioksidan. Senyawa ini dapat larut dalam air dan pelarut organik. Metode ABTS•+ digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan dari senyawa yang bersifat lipofilik dan hidrofilik (Zurowska dkk, 2012).

Berdasarkan penelitian oleh Biskup dkk, 2013, aktivitas antioksidan juga dipengaruhi oleh adanya gugus karboksilat. Adanya gugus RCOO⁻ bekerja sebagai donor elektron untuk proses transfer elektron. Senyawa yang dapat berfungsi sebagai donor elektron adalah senyawa yang kaya π-elektron seperti senyawa aromatik yang tersubstitusi dengan gugus elektron donor (Siswandono dkk, 2000). Pada penelitian ini senyawa (18) yang tersubstitusi gugus karboksilat memiliki nilai IC₅₀ 4.3 µM yang lebih besar dibandingkan senyawa (23) yang tidak tersubstitusi gugus karboksilat dengan IC₅₀ 5.3µM. Selain itu posisi gugus hidroksi juga berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan. Senyawa fenol dengan dua gugus hidroksi yang berikatan pada cincin aromatik pada posisi para memiliki aktivitas antioksidan yang lebih besar dibandingkan dengan senyawa fenol yang tersubstitusi pada posisi orto dan meta (Biskup dkk, 2012).

Berdasarkan strukturnya, senyawa Ea.D₆ dan trolox memiliki kesamaan adanya gugus hidroksi dan karboksilat dalam cincin aromatik yang berperan dalam penghambatan ABTS. Jumlah substitusi gugus hidroksi pada cincin aromatik yang menyebabkan aktivitas penghambatan dua senyawa tersebut berbeda. Sedangkan pada senyawa Ea.D₅H hanya memiliki gugus hidroksi dalam

cincin aromatik. Hal ini yang mengakibatkan aktivitas penghambatan senyawa Ea.D₅H lebih kecil dibandingkan senyawa lainnya.

Berdasarkan penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa yang dapat dijadikan sebagai inhibitor α -glukosidase, aldosa reduktase, DPPH dan ABTS dari daun salam adalah senyawa yang memiliki kerangka dasar aromatik yang tersubstitusi gugus hidroksi dan asam karboksilat. Hasil uji fitokimia dari daun salam dapat disimpulkan bahwa potensi senyawa lain yang aktif masih ada, sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut.

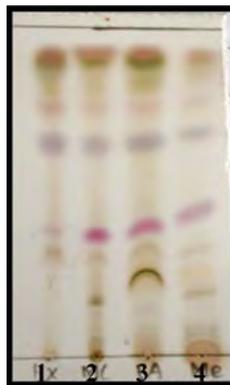
“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Pendahuluan dan Uji Fitokimia *Syzygium polyanthum*

Uji pendahuluan pada *Syzygium polyanthum* Wight digunakan untuk mengetahui pelarut yang dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel. Hasil maserasi dari masing-masing vial dimonitoring menggunakan plat KLT dengan serum sulfat sebagai penampak noda seperti pada Gambar 4.1. Berdasarkan hasil kromatogram uji pendahuluan, pelarut metanol mampu mengambil senyawa-senyawa yang lebih polar, sedangkan hasil maserasi menggunakan pelarut *n*-heksana hanya dapat mengambil sedikit senyawa yang lebih polar. Maka hasil dari uji pendahuluan dapat disimpulkan bahwa pelarut yang sesuai untuk proses ekstraksi adalah metanol.



1. *n*-Heksana
2. Metilen klorida
3. Etil Asetat
4. Metanol

Gambar 4.1. Kromatogram hasil uji pendahuluan *S. polyanthum* dengan eluen DCM : MeOH (98 :2)

Uji Fitokimia pada *Syzygium polyanthum* Wight digunakan untuk mengetahui senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak daun salam. Hasil uji fitokimia masing-masing ekstrak daun salam dengan beberapa metode uji seperti pada Tabel 4.1, menunjukkan bahwa ekstrak-*n*-heksana dan etil asetat memiliki kandungan senyawa flavonoid, alkaloid dan terpenoid. Pada ekstrak metanol menunjukkan adanya senyawa saponin, tanin, flavonoid, alkaloid, triterpenoid dan gula pereduksi. Sedangkan pada senyawa antrakuinon tidak sama sekali terdapat pada semua ekstrak daun salam.

Tabel 4.1. Uji Fitokimia dari ekstrak metanol, etil asetat dan *n*-heksana daun salam

Hasil Uji Fitokimia			
Uji Fitokimia	H.E	E.E	M.E
Saponin	-	-	+
Tanin	-	-	+
Flavonoid	+	+	+
Alkaloid	+	+	+
Triterpen	+	+	+
Antrakuinon	-	-	-
Karbohidrat	-	-	+

Keterangan : + menunjukkan adanya senyawa, - menunjukkan tidak adanya senyawa; H E, ekstrak *n*-heksana ; EE, ekstrak etil asetat ; M E, ekstrak metanol

Berdasarkan hasil uji fitokimia tersebut, ekstrak daun salam menggunakan pelarut metanol memiliki kandungan senyawa yang lebih banyak dibandingkan ekstrak salam dengan pelarut lainnya. Pelarut metanol merupakan pelarut yang bersifat polar dan biasanya digunakan untuk ekstraksi dengan tujuan efisiensi. Hal ini karena pelarut metanol mampu mengambil senyawa-senyawa yang bersifat polar. Sehingga berdasarkan hasil uji pendahuluan dan uji fitokimia tersebut dapat disimpulkan bahwa pelarut yang sesuai untuk ekstraksi adalah pelarut metanol.

Ekstrak metanol selanjutnya dipartisi dengan pelarut *n*-heksana dan etil asetat. Hasil uji fitokimia masing-masing fraksi daun salam seperti pada Tabel 4.2. Fraksi air dan etil asetat menunjukkan adanya senyawa saponin, tanin, flavonoid, alkaloid, triterpenoid dan gula pereduksi. Fraksi *n*-heksana menunjukkan adanya senyawa flavonoid, alkaloid dan triterpenoid. Pada daun salam tidak terdapat senyawa antrakuinon pada semua fraksi yang diuji. Berdasarkan hasil uji fitokimia tersebut, fraksi air dan fraksi etil asetat memiliki kandungan senyawa yang lebih banyak dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana.

Sehingga dapat disimpullkan bahwa fraksi dari ekstrak metanol yang sesuai untuk proses pemisahan selanjutnya adalah fraksi air dan fraksi etil asetat.

Tabel 4.2. Uji Fitokimia dari fraksi air, etil asetat dan *n*-heksana dari ekstrak metanol daun salam

Uji Fitokimia	Hasil Uji Fitokimia		
	A.F	E.F	H.F
Saponin	+	+	-
Tanin	+	+	-
Flavonoid	+	+	+
Alkaloid	+	+	+
Triterpen	+	+	+
Antrakuinon	-	-	-
Karbohidrat	+	+	-

Keterangan : + menunjukkan adanya senyawa, - menunjukkan tidak adanya senyawa; AF, fraksi air ; E.F, fraksi etil asetat ; H.F, fraksi *n*-heksana

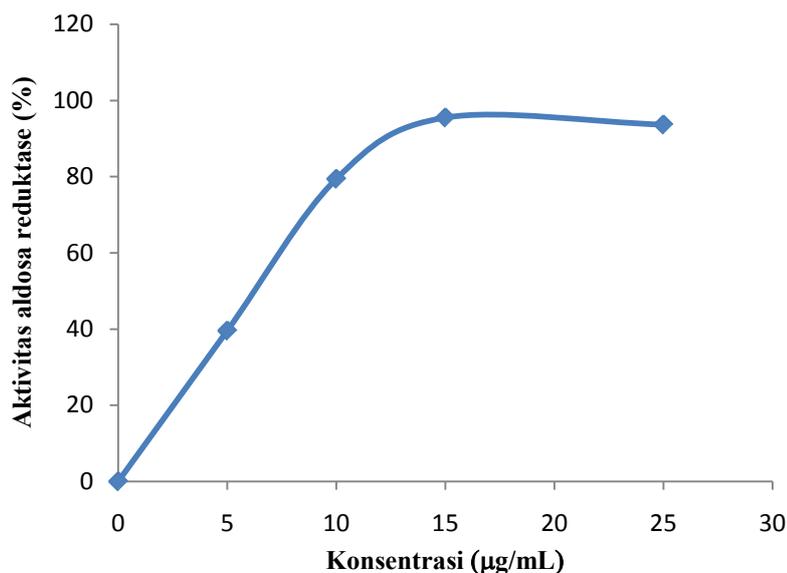
4.2 Aktivitas Biologis Ekstrak *S.polyanthum* Wight

4.2.1 Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase

Enzim α -glukosidase merupakan enzim karbohidrase yang mengkatalis pembebasan glukosa dari substrat gula non pereduksi dengan memecah ikatan glikosida. Penghambatan enzim α -glukosidase ini dilakukan oleh suatu inhibitor yang dapat memperlambat penyerapan glukosa melalui hidrolisis enzim α -glukosidase dalam saluran pencernaan. Inhibitor yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol *S. polyanthum* Wight. Uji aktivitas pada ekstrak ini digunakan untuk mengetahui besarnya aktivitas biologis dari senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Hasil uji penghambatan α -glukosidase pada ekstrak metanol dengan konsentrasi 333 μ g/mL menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas penghambatan sebesar 81,60 %.

4.2.2 Aktivitas Penghambatan Aldosa Reduktase

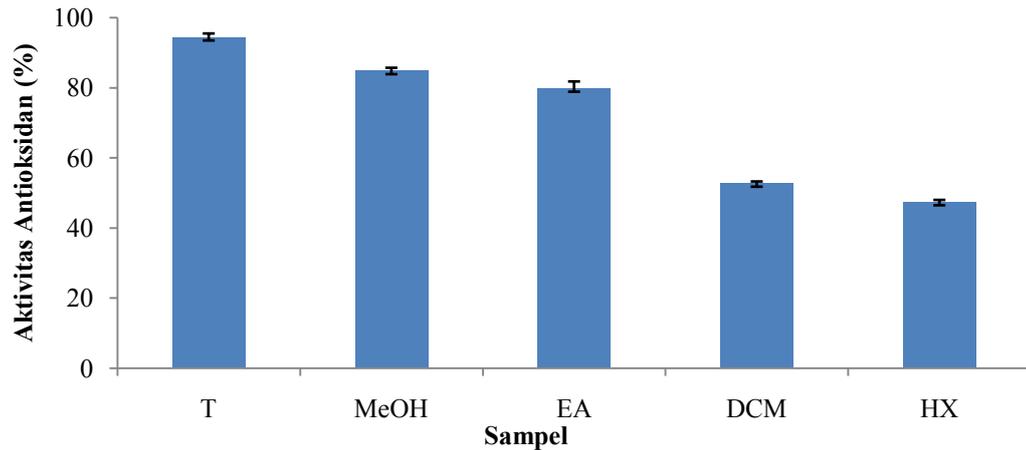
Aldosa reduktase merupakan enzim yang bekerja untuk mengkatalis proses reduksi glukosa menjadi sorbitol. Sorbitol yang dihasilkan dapat menyebabkan kerusakan sel. Inhibitor aldosa reduktase sangat diperlukan untuk memperlambat proses terbentuknya sorbitol yang ditandai dengan penurunan NADPH. Ekstrak metanol *Syzygium polyanthum* Wight diuji aktivitasnya terhadap enzim aldosa reduktase. Hasil uji penghambatan aldosa reduktase pada ekstrak metanol dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas penghambatan sebesar 93,65 %. Selanjutnya ekstrak metanol ditentukan nilai IC_{50} dengan menggunakan variasi konsentrasi. Berdasarkan kurva penghambatan pada Gambar 4.2, maka ekstrak metanol memiliki nilai IC_{50} sebesar 6,12 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 4.2 Aktivitas penghambatan aldosa reduktase pada ekstrak metanol *S. polyanthum*.

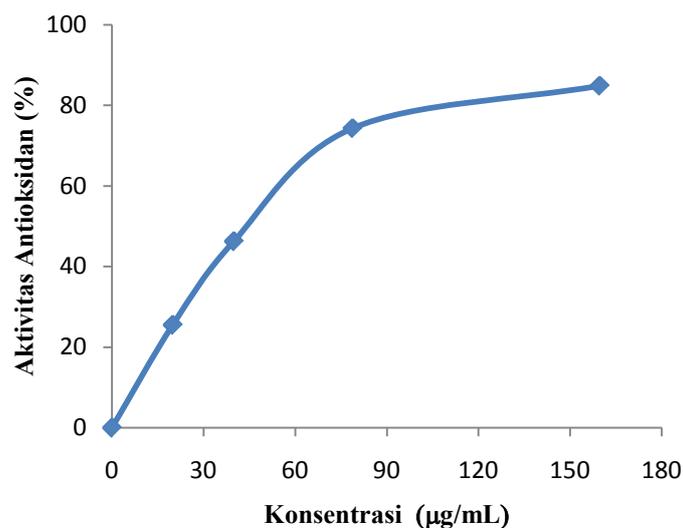
4.2.3 Aktivitas Penghambatan DPPH

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menambahkan larutan DPPH ke dalam larutan sampel ekstrak. Hasil inkubasi dari keempat ekstrak diukur menggunakan spektrofotometri UV/VIS dan diperoleh nilai absorbansi sampel. Nilai tersebut selanjutnya dihitung berdasarkan rumus (3) sehingga diperoleh aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak seperti pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Aktivitas DPPH dari ekstrak *S. polyanthum* pada konsentrasi 159,73 $\mu\text{g/mL}$, MeOH, ekstrak metanol; EA, ekstrak etil asetat; DCM, ekstrak diklorometana; Hx, ekstrak *n*-heksana dan T, trolox (kontrol positif). Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, $n=3$.

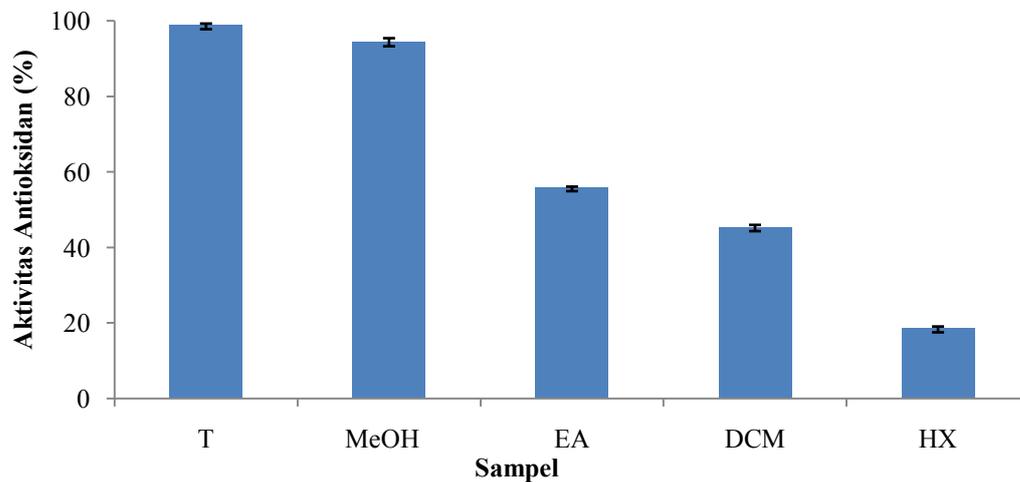
Berdasarkan hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH pada konsentrasi 159,73 $\mu\text{g/mL}$, ekstrak metanol memiliki aktivitas inhibisi yang lebih besar dibandingkan ekstrak lainnya, yaitu 84,85 % \pm 0,52. Ekstrak etil asetat, diklorometana, dan *n*-heksana memiliki aktivitas inhibisi DPPH masing-masing sebesar 79,85 % \pm 0,49 ; 52,74% \pm 1,93 ; 47,45 % \pm 0,82. Selanjutnya ekstrak metanol ditentukan nilai IC_{50} dengan menggunakan variasi konsentrasi. Berdasarkan kurva penghambatan DPPH pada Gambar 4.4, maka ekstrak metanol memiliki nilai IC_{50} sebesar 44,35 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 4.4 Aktivitas penghambatan DPPH pada ekstrak metanol *S. polyanthum*.

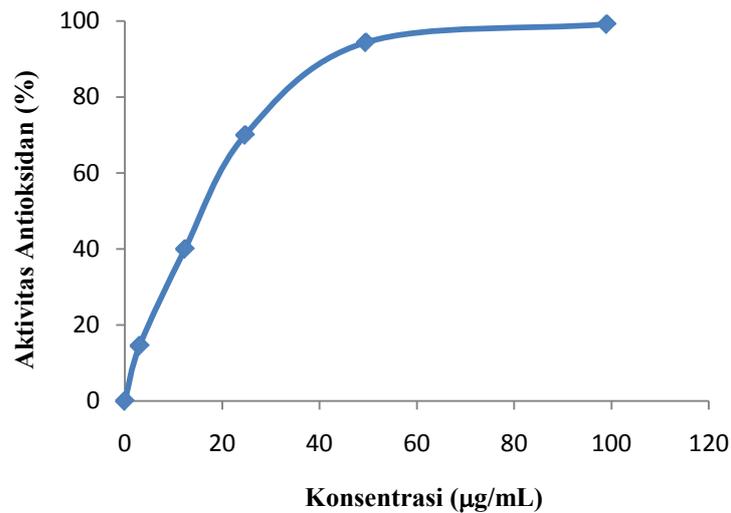
4.2.4 Aktivitas Penghambatan ABTS

Aktivitas penghambatan ABTS dilakukan dengan menambahkan larutan ABTS ke dalam larutan ekstrak. Hasil uji aktivitas antioksidan dari keempat ekstrak diukur menggunakan spektrofotometri UV/VIS. Nilai absorbansi sampel dihitung berdasarkan rumus (3) sehingga diperoleh aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak seperti pada Gambar 4.5. Berdasarkan hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode ABTS pada konsentrasi $49,5\mu\text{g/mL}$, ekstrak metanol memiliki aktivitas inhibisi yang lebih besar dibandingkan ekstrak lainnya, yaitu $94,33\% \pm 1,14$. Ekstrak etil asetat, diklorometana, dan *n*-heksana memiliki aktivitas inhibisi ABTS masing-masing sebesar $55,96\% \pm 0,20$; $45,37\% \pm 0,67$; $18,57\% \pm 0,47$.



Gambar 4.5 Aktivitas ABTS dari ekstrak *S. polyanthum* pada konsentrasi $49,5\mu\text{g/mL}$, MeOH, ekstrak metanol; EA, ekstrak etil asetat; DCM, ekstrak diklorometana; HX, ekstrak *n*-heksana dan T, trolox (kontrol positif). Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, $n=3$.

Ekstrak metanol menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih besar dibandingkan ekstrak lainnya, sehingga ekstrak tersebut ditentukan nilai IC_{50} dengan variasi konsentrasi. Kurva penghambatan ABTS pada Gambar 4.6, menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki nilai IC_{50} sebesar $17,69\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan hasil uji pendahuluan dan uji aktivitas ekstrak *S. polyanthum*, dapat disimpulkan bahwa pelarut yang sesuai untuk proses ekstraksi adalah metanol.



Gambar 4.6 Aktivitas penghambatan ABTS pada ekstrak metanol *S. polyanthum*.

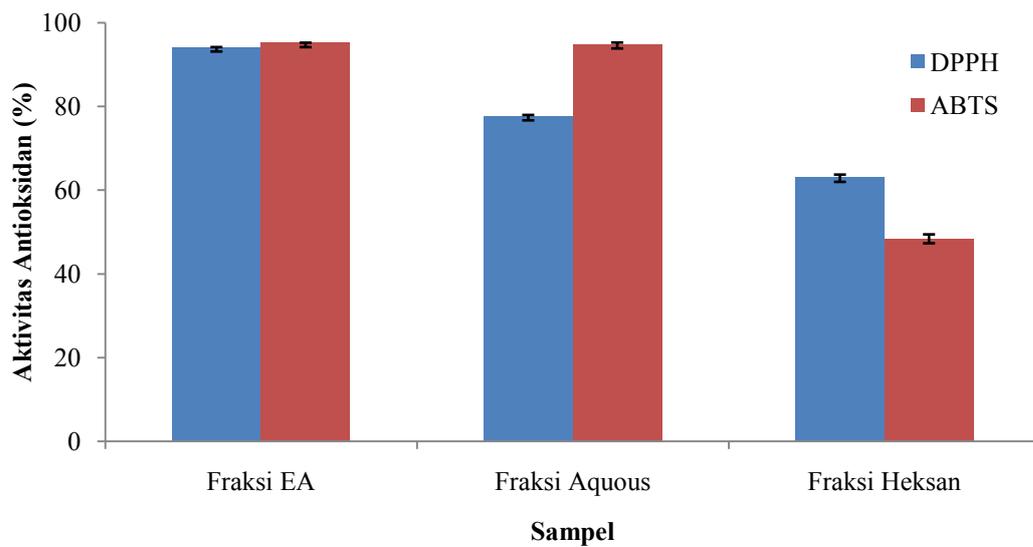
4.3 Isolasi Senyawa *S. polyanthum*

4.3.1 Ekstraksi Tanaman *S. polyanthum*

Serbuk kering *S. polyanthum* sebanyak 3,5 kg dilakukan ekstraksi padat-cair menggunakan metode maserasi. Metode ini dipilih karena memiliki beberapa kelebihan, antara lain dapat mengekstrak sampel dalam jumlah yang cukup besar, penggunaannya mudah, praktis, dan dapat dilakukan pada suhu kamar sehingga senyawa-senyawa tidak terdekomposisi (Kristanti dkk, 2008). Maserasi serbuk kering daun salam dilakukan selama 1x24 jam menggunakan pelarut metanol sebanyak 21 L. Hasil maserasi dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak pekat sebanyak 245,2 g.

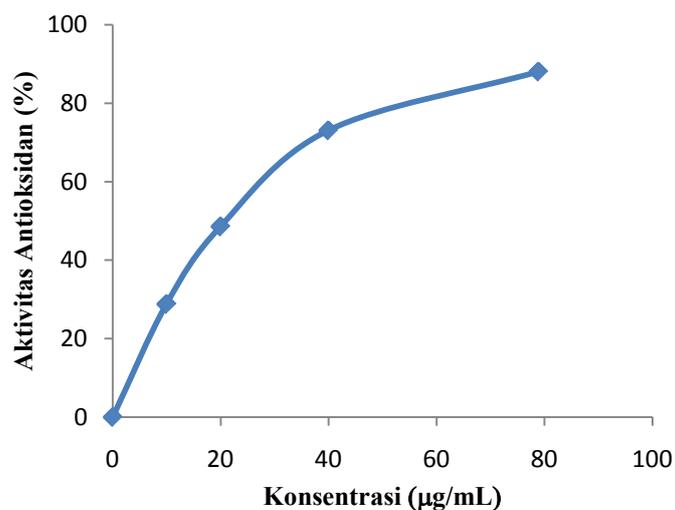
4.3.2 Fraksinasi Ekstrak Pekat Metanol

Ekstrak pekat metanol diambil 196,5 g disuspensikan dalam MeOH:H₂O 2:1 (3 L) kemudian dipartisi dengan pelarut *n*-heksana dan etil asetat. Selanjutnya Fraksi cair dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi *n*-heksana (73,34 g), fraksi etil asetat (47,58 g), dan fraksi aquous (47,56 g). Hasil ketiga fraksi tersebut diuji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH pada konsentrasi 159,73 µg/mL dan ABTS pada konsentrasi 49,5µg/mL seperti pada Gambar 4.7.

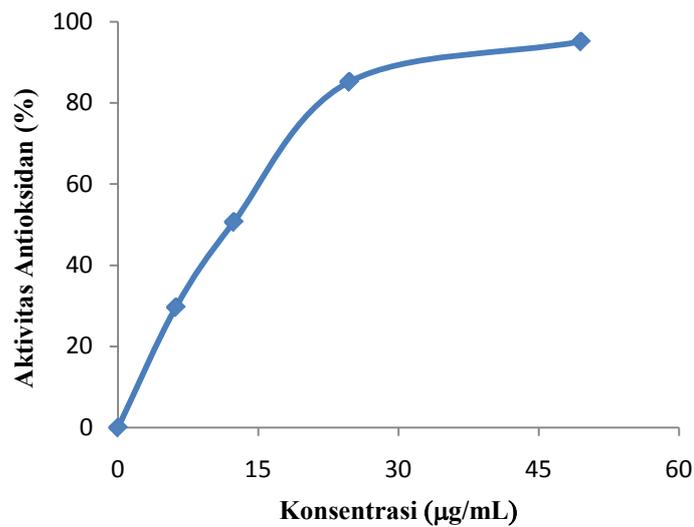


Gambar 4.7 Aktivitas DPPH dari fraksi *S. polyanthum* pada konsentrasi 159,73 $\mu\text{g/mL}$ dan aktivitas ABTS dari fraksi *S. polyanthum* pada konsentrasi 49,5 $\mu\text{g/mL}$. Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, $n=3$.

Berdasarkan kromatogram uji aktivitas antioksidan, fraksi etil asetat, aquous dan *n*-heksana memiliki aktivitas penghambatan DPPH masing-masing sebesar 94,08 %, 77,64% dan 62,94 % pada konsentrasi 159,73 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan aktivitas penghambatan ABTS pada ketiga fraksi tersebut masing-masing sebesar 95,12 % , 94,81 % dan 48,27 % pada konsentrasi 49,5 $\mu\text{g/mL}$. Hasil aktivitas antioksidan pada ketiga fraksi tersebut menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas penghambatan yang lebih besar dibandingkan fraksi lainnya.

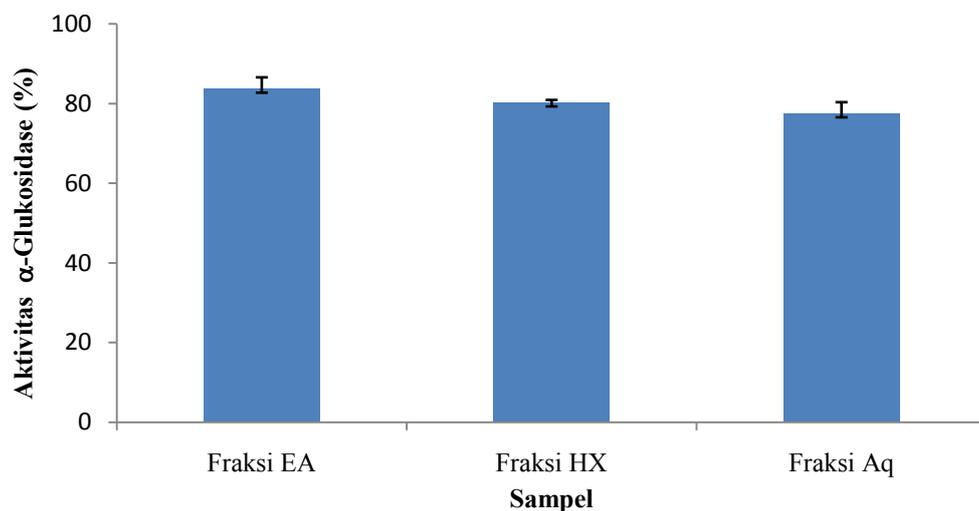


Gambar 4.8 Aktivitas penghambatan DPPH pada fraksi etil asetat *S. polyanthum*.



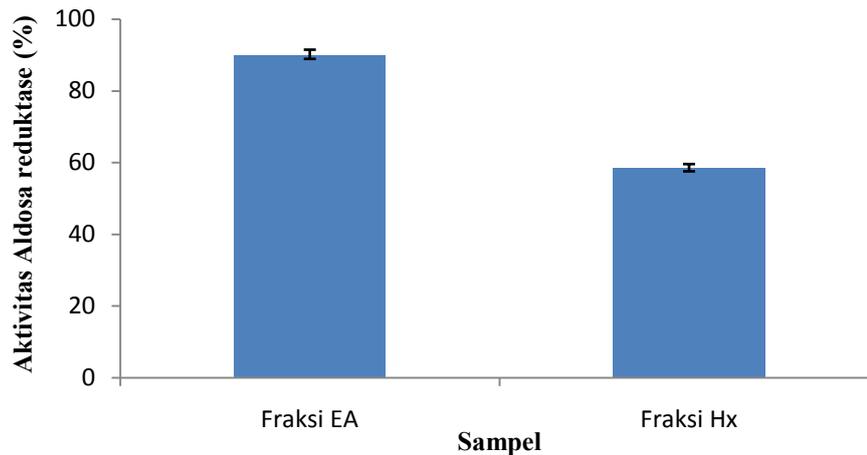
Gambar 4.9 Aktivitas penghambatan ABTS pada fraksi etil asetat *S. polyanthum*.

Berdasarkan kurva penghambatan DPPH pada Gambar 4.8, fraksi etil asetat memiliki nilai IC_{50} sebesar $21,75\mu\text{g/mL}$. Sedangkan kurva penghambatan ABTS pada Gambar 4.9, menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki nilai IC_{50} sebesar $11,82\ \mu\text{g/mL}$. Selain dilakukan uji antioksidan, ketiga fraksi tersebut dilakukan uji aktivitas α -glukosidase pada konsentrasi $333\ \mu\text{g/mL}$ seperti pada Gambar 4.10



Gambar 4.10 Aktivitas penghambatan α -glukosidase pada konsentrasi $333\ \mu\text{g/mL}$ dari fraksi *S. polyanthum*. Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, $n=3$.

Berdasarkan kromatogram uji aktivitas α -glukosidase pada Gambar 4.10, fraksi etil asetat, *n*-heksana dan aquous memiliki aktivitas penghambatan α -glukosidase masing-masing sebesar $83,73 \% \pm 2,85$; $80,28 \% \pm 0,62$; $77,55 \% \pm 2,79$. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dan *n*-heksana memiliki aktivitas penghambatan yang lebih besar dibandingkan fraksi aquous. Kedua fraksi aktif tersebut, selanjutnya diuji aktivitas penghambatan aldosa reduktase pada konsentrasi $100 \mu\text{g/mL}$ seperti pada Gambar 4.11.



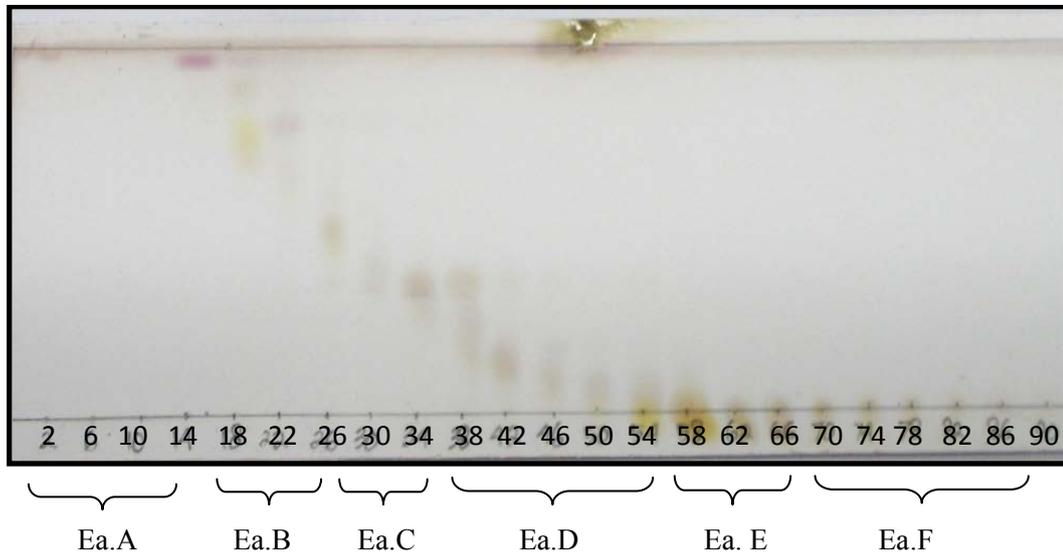
Gambar 4.11 Aktivitas penghambatan aldosa reduktase pada konsentrasi $100 \mu\text{g/mL}$ dari fraksi *S. polyanthum*. Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, $n=3$.

Berdasarkan kromatogram uji aktivitas aldosa reduktase pada Gambar 4.11, fraksi etil asetat dan *n*-heksana memiliki aktivitas penghambatan aldosa reduktase masing-masing sebesar $89,92 \% \pm 1,58$ dan $58,57 \% \pm 1,58$. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan fraksi *n*-heksana. Sehingga berdasarkan uji aktivitas penghambatan DPPH, ABTS, α -glukosidase dan aldosa reduktase pada fraksi *S. polyanthum*, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat memiliki potensi kandungan senyawa aktif sehingga dilakukan fraksinasi lebih lanjut.

4.3.3 Fraksinasi Fraksi Etil Asetat

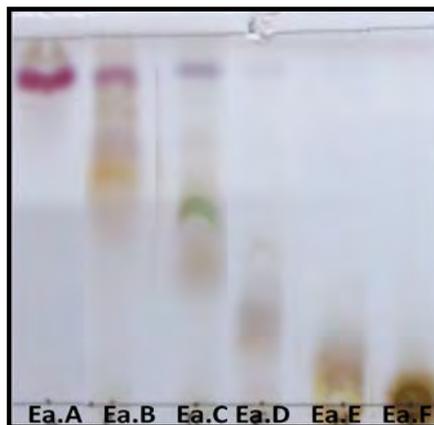
Fraksi etil asetat diambil sebanyak $40,16 \text{ g}$ dan difraksinasi menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV) dengan campuran eluen *n*-heksana:EtOAc ($100:0 \rightarrow 20:80$), EtOAc : MeOH ($100:0 \rightarrow 20:80$). Metode KCV digunakan karena

metode ini dapat digunakan untuk sampel yang cukup banyak dan lebih cepat karena menggunakan tekanan tinggi. Hasil fraksinasi dimonitoring menggunakan KLT seperti pada Gambar 4.12 berikut.



Gambar 4.12 Kromatogram hasil fraksinasi fraksi etil asetat dielusi dengan eluen *n*-heksana : EtOAc (75 : 25)

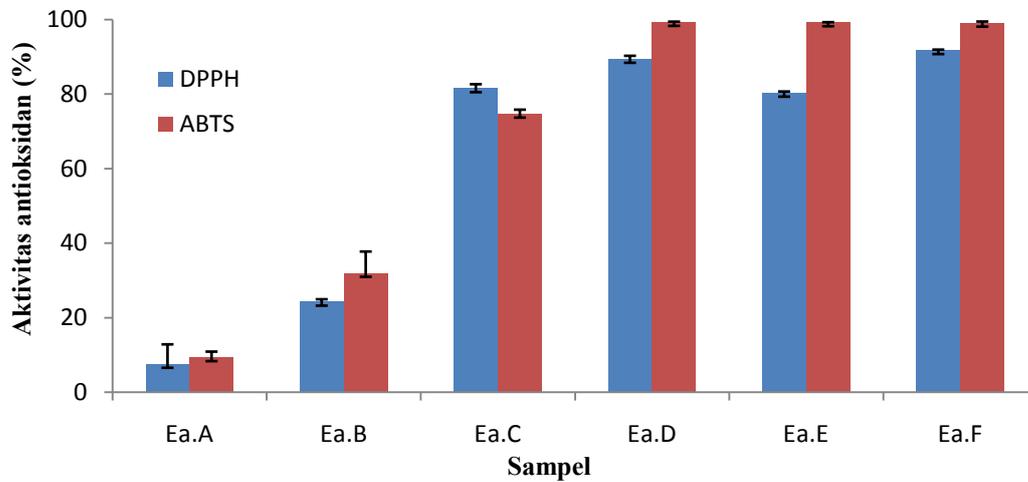
Noda yang memiliki Rf relatif sama digabung sehingga diperoleh beberapa fraksi yang lebih sederhana seperti pada Gambar 4.13.



Gambar 4.13 Kromatogram fraksi gabungan hasil fraksinasi fraksi etil asetat dengan eluen *n*-heksana : EtOAc (75 : 25)

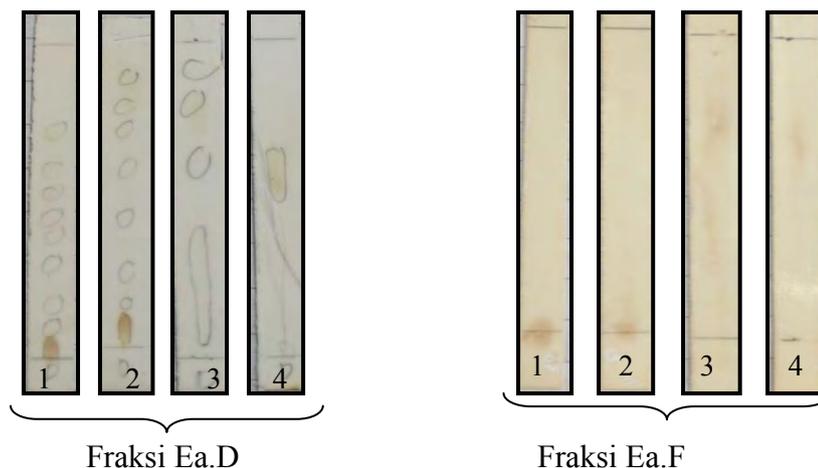
Fraksi gabungan diperoleh sebanyak 6 fraksi, yaitu fraksi Ea.A, Ea.B, Ea.C, Ea.D, Ea.E dan Ea.F. Selanjutnya setiap fraksi tersebut diuji aktivitas antioksidan terhadap DPPH dan ABTS seperti pada Gambar 4.14. Berdasarkan

hasil uji antioksidan, fraksi Ea.D dan Ea.F memiliki aktivitas yang lebih besar dibanding fraksi lainnya.



Gambar 4.14 Aktivitas DPPH dari fraksi Etil asetat pada konsentrasi 159,73 $\mu\text{g/mL}$, aktivitas ABTS dari fraksi etil asetat pada konsentrasi 99 $\mu\text{g/mL}$ dari *S. polyanthum*. Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, n=3.

Selanjutnya fraksi Ea.D dan Ea.F dimonitoring dengan KLT seperti pada Gambar 4.15, untuk menentukan fraksi yang akan dipisahkan lebih lanjut. Selain itu monitoring ini bertujuan untuk mengetahui sistem eluen yang digunakan dalam pemisahan.

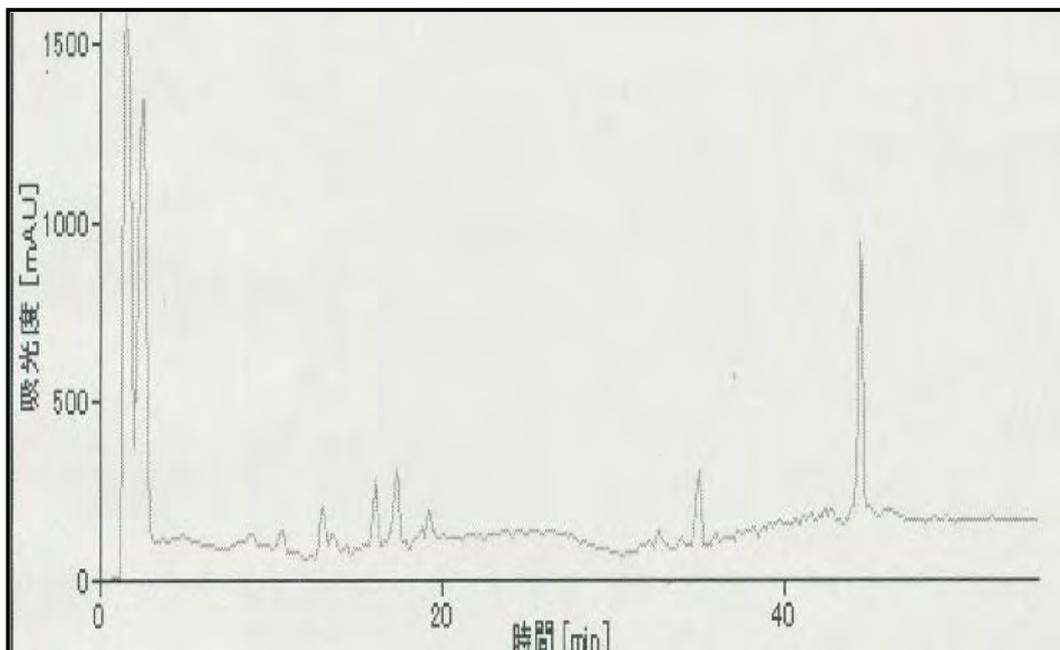


Gambar 4.15. Kromatogram fraksi Ea.D (1. Hx:CHCl₃ 20:80, 2.Hx:CHCl₃ 0:100, 3. CHCl₃:MeOH 50:50, 4. CHCl₃:MeOH 0:100) dan fraksi Ea.F(1. Hx:CHCl₃ 0:100, 2. CHCl₃: MeOH 80:20, 3. CHCl₃:MeOH 50:50, 4. CHCl₃:MeOH 0:100).

Berdasarkan kromatogram KLT fraksi Ea.D (Gambar 4.15) menunjukkan bahwa fraksi tersebut memiliki noda yang pemisahannya lebih jelas bila dibandingkan dengan fraksi Ea.F. Penggunaan variasi eluen pada fraksi Ea.F tidak menunjukkan noda yang pemisahan yang baik, sehingga pemilihan eluen yang tepat untuk fraksinasi selanjutnya lebih sulit bila dibandingkan dengan fraksi Ea.D. Oleh karena itu fraksi Ea.D dipilih untuk fraksinasi lebih lanjut dengan didukung data aktivitas penghambatan DPPH sebesar $81,48 \pm 1,15$ % pada konsentrasi $159,73 \mu\text{g/mL}$ dan penghambatan ABTS sebesar $99,28 \pm 0,14$ % pada konsentrasi $99 \mu\text{g/mL}$.

4.3.4 Fraksinasi Fraksi Ea-D

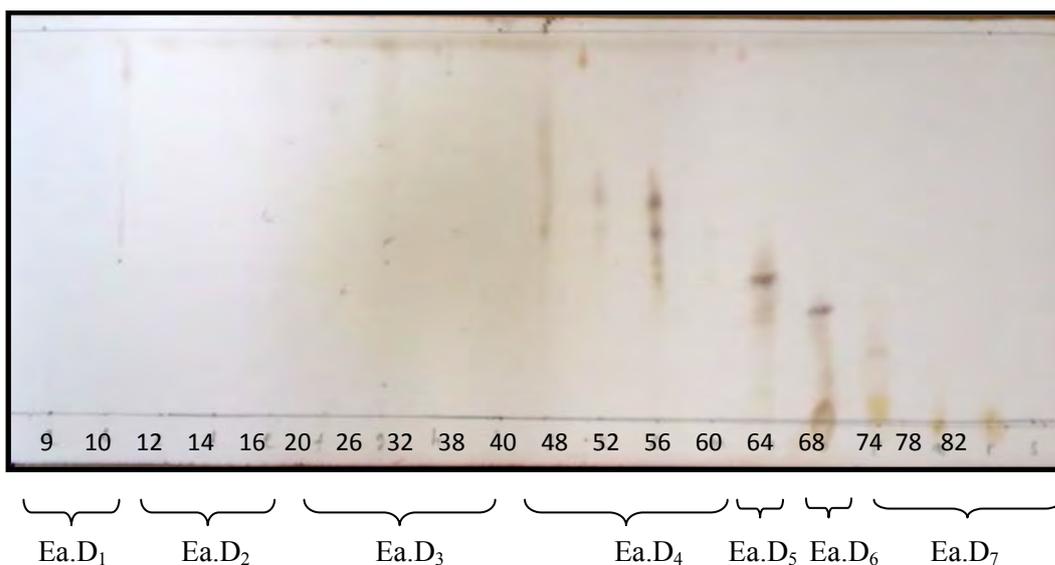
Berdasarkan hasil kromatogram fraksi Ea-D selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan HPLC untuk mengetahui profil puncak dari senyawa seperti pada (Gambar 4.16). Pada kondisi ini fraksi Ea-D dianalisa menggunakan sistem gradien $\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH}$ ($80:20 \rightarrow 50:50 \rightarrow 0:100$), laju alir 1 mL/menit , konsentrasi sampel 1 mg/mL , volume injeksi $30 \mu\text{L}$, waktu analisa 55 menit dan menggunakan kolom inertsil ODS- $35 \mu\text{m}$ $4,6 \times 150 \text{ mm}$.



Gambar 4.16 Kromatogram HPLC fraksi Ea-D

Kromatogram HPLC analitik fraksi Ea-D seperti pada Gambar 4.16, menunjukkan bahwa fraksi tersebut memiliki beberapa puncak senyawa dengan adanya tujuh subfraksi apabila dilakukan pemisahan. Kromatogram tersebut memberikan informasi bahwa fraksi Ea-D belum murni dan perlu pemisahan lebih lanjut. Berdasarkan hasil uji kromatografi KLT, HPLC dan penghambatan antioksidan fraksi Ea-D, dapat disimpulkan bahwa fraksi Ea-D merupakan fraksi yang tepat untuk pemisahan selanjutnya karena pemilihan eluennya mudah dilakukan, noda pemisahan jelas, serta berpotensi sebagai antioksidan.

Fraksi Ea-D sebanyak 2,025 g dipisahkan lebih lanjut menggunakan metode KKG (kromatografi kolom grafitasi) menggunakan eluen campuran *n*-heksana: CHCl₃ (80:20 → 0:100), CHCl₃ : MeOH (90:10 → 0:100). Hasil fraksinasi dimonitoring menggunakan KLT seperti pada Gambar 4.17.



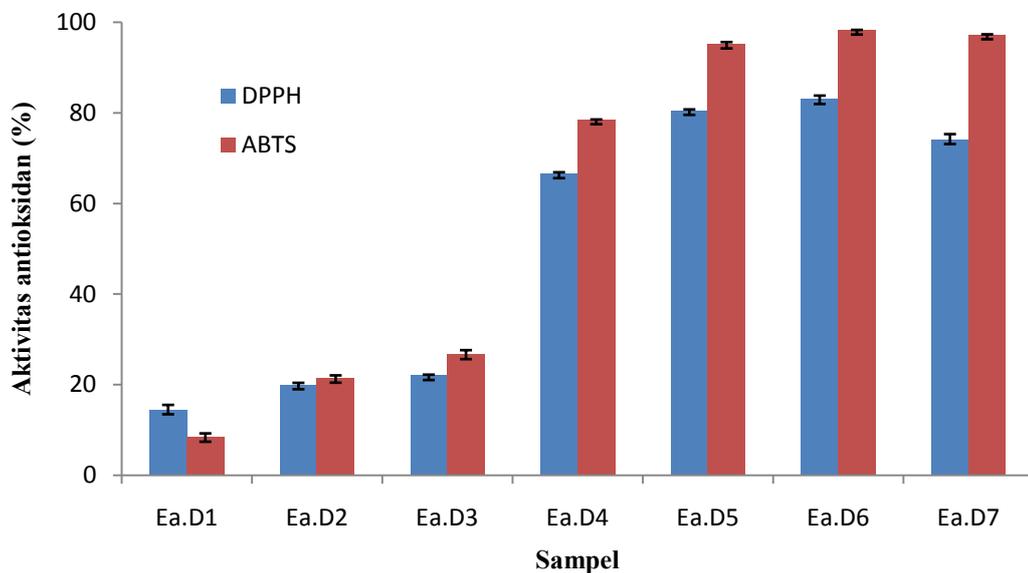
Gambar 4.17. Kromatogram hasil fraksinasi fraksi Ea.D dielusi dengan eluen CHCl₃ : MeOH (90:10)

Noda yang memiliki Rf sama digabung sehingga diperoleh beberapa fraksi yang lebih sederhana seperti pada Gambar 4.18. Fraksi gabungan diperoleh sebanyak 7 fraksi, yaitu fraksi Ea.D₁, Ea.D₂, Ea.D₃, Ea.D₄, Ea.D₅, Ea.D₆ dan Ea.D₇. Dari beberapa fraksi gabungan tersebut, hanya fraksi Ea.D₆ yang terbentuk kristal jarum berwarna putih.



Gambar 4.18 Kromatogram fraksi gabungan hasil fraksinasi Ea.D dengan eluen CHCl_3 : MeOH (90:10)

Selanjutnya setiap fraksi tersebut diuji aktivitas antioksidan terhadap DPPH dan ABTS seperti pada Gambar 4.19. Berdasarkan hasil uji antioksidan, fraksi Ea.D₅, Ea.D₆ dan Ea.D₇ memiliki aktivitas yang lebih besar dibanding fraksi lainnya.



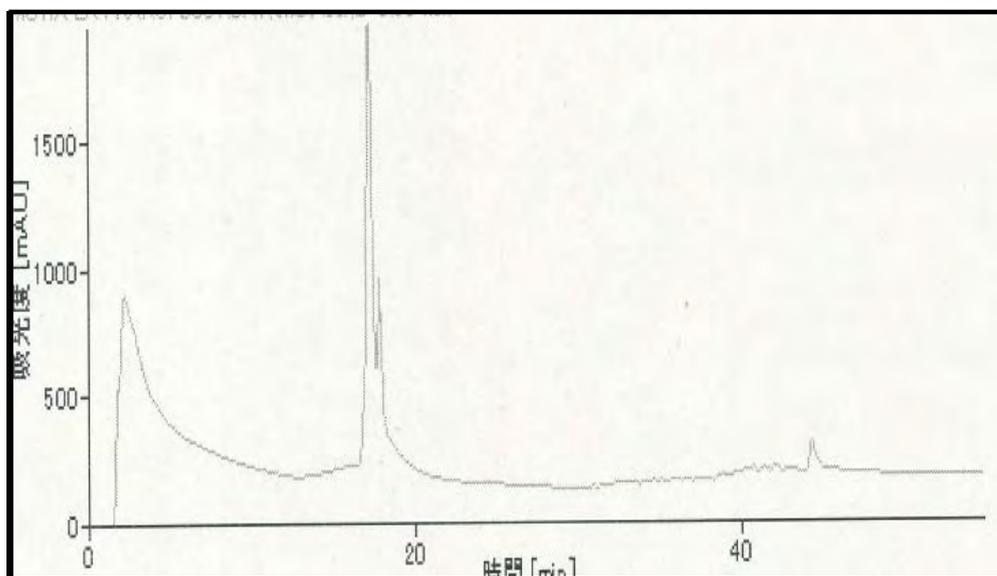
Gambar 4.19 Aktivitas DPPH dari fraksi Ea.D *S. polyanthum* pada konsentrasi 159,73 $\mu\text{g/mL}$ dan aktivitas ABTS dari fraksi Ea.D *S. polyanthum* pada konsentrasi 49,5 $\mu\text{g/mL}$. Setiap kolom menunjukkan nilai rata-rata \pm SD, n=3.

Berdasarkan kromatogram KLT fraksi gabungan Ea-D₆ yang menunjukkan adanya noda sederhana dan terbentuk kristal jarum berwarna putih pada fraksi tersebut, serta didukung dengan data uji penghambatan antioksidan (Gambar 4.19) menggunakan metode uji DPPH dan ABTS pada fraksi Ea.D₆, maka fraksi Ea.D₆ dipilih untuk proses fraksinasi selanjutnya.

Fraksi Ea-D₆ yang berbentuk kristal jarum perlu dilakukan analisa dengan HPLC analitik untuk mengetahui kemurnian fraksi tersebut, selain itu HPLC analitik ini digunakan untuk mencari sistem eluen yang tepat pada proses pemurnian.

4.3.5 Pemurnian Fraksi Ea-D₆ dan Ea-D₅

Fraksi Ea.D₆ selanjutnya dianalisa dengan HPLC seperti pada (Gambar 4.20) menggunakan sistem gradien H₂O : MeOH (80:20→50:50→ 0 :100), laju alir 1 m L/menit, konsentrasi sampel 1 m g/mL, volume injeksi 30 μ L, waktu analisa 55 menit dan menggunakan kolom inertsil ODS-3 5 μm 4,6 x 150 mm.

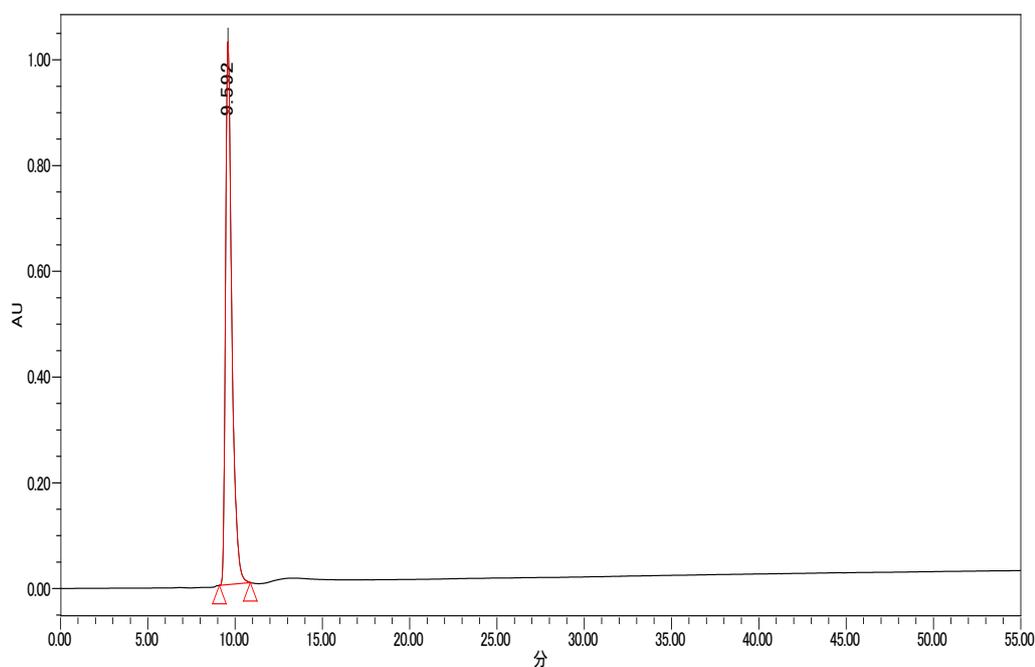


Gambar 4.20 Kromatogram HPLC fraksi Ea.D₆

Kromatogram HPLC fraksi Ea.D₆ seperti pada Gambar 4.20, menunjukkan bahwa fraksi tersebut memiliki beberapa puncak yang lebih sederhana bila dibandingkan kromatogram HPLC fraksi Ea.D. Fraksi Ea.D₆

(0,210 g) diperoleh sebagai serbuk berwarna putih. Berdasarkan hasil kromatografi HPLC, fraksi Ea.D₆ menunjukkan bahwa fraksi tersebut belum murni sehingga perlu dimurnikan dengan preparatif RP-HPLC ODS menggunakan eluen H₂O : MeOH (50:50) sistem isokratik, laju alir 5 mL/mnt, volume injeksi 300 μL, waktu analisa 15 m enit dan menggunakan kolom inersustain C18 (φ 25 x 250 mm).

Kemurnian kristal yang diperoleh ditentukan menggunakan HPLC analitik dengan eluen H₂O : MeOH (50:50) sistem isokratik seperti pada Gambar 4.21, selain itu dilakukan juga uji 3 eluen yang berbeda kepolarannya (Gambar 4.22). Senyawa ini diperoleh sebanyak 72 mg.



Gambar 4.21 Kromatogram HPLC analitik fraksi Ea.D₆ setelah dilakukan HPLC preparatif menggunakan sistem isokratik H₂O :MeOH (50:50).

Kromatogram HPLC analitik pada fraksi Ea.D₆ seperti pada Gambar 4.21 menunjukkan adanya puncak tunggal pada waktu retensi 9,502 menit. Senyawa ini murni karena memiliki puncak tunggal. Selanjutnya senyawa tersebut dimonitoring KLT menggunakan tiga eluen yang berbeda kepolaran untuk mengetahui kemurniannya. Berdasarkan kromatogram KLT pada Gambar 4.22

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa isolasi ekstrak metanol dari daun salam menghasilkan dua senyawa yaitu (3,4,5-trihidroksi-asam benzoat dan benzofuranpropanol. Hasil uji aktivitas penghambatan antidiabetes menggunakan enzim aldosa reduktase menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas penghambatan α -glukosidase.. Ekstrak metanol juga menunjukkan penghambatan DPPH dan ABTS. Setelah melalui proses fraksinasi, fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas penghambatan DPPH dan ABTS yang lebih besar dibandingkan fraksi lainnya. Hasil uji aktivitas penghambatan antidiabetes menggunakan enzim α -glukosidase menunjukkan bahwa asam galat memiliki aktivitas penghambatan. Selain itu aktivitas antioksidan asam galat menunjukkan penghambatan terhadap DPPH dan ABTS.

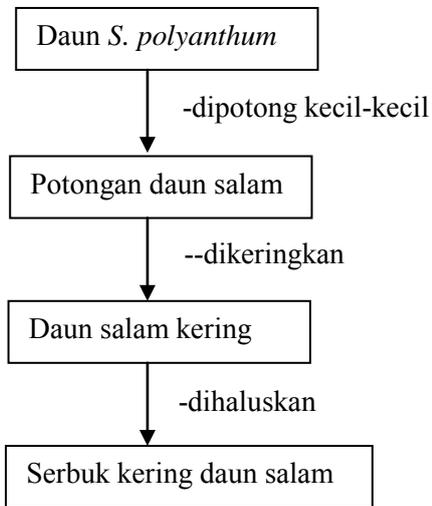
5.2 Saran

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan agar dapat digunakan sebagai obat antiabetes dengan uji *in-vivo* dan uji tingkat keamanan senyawa asam galat. Penelitian bioaktivitas antidiabetes senyawa benzofuranpropanol perlu dilakukan. Selain itu isolasi senyawa poten dari fraksi-fraksi aktif perlu dilaksanakan.

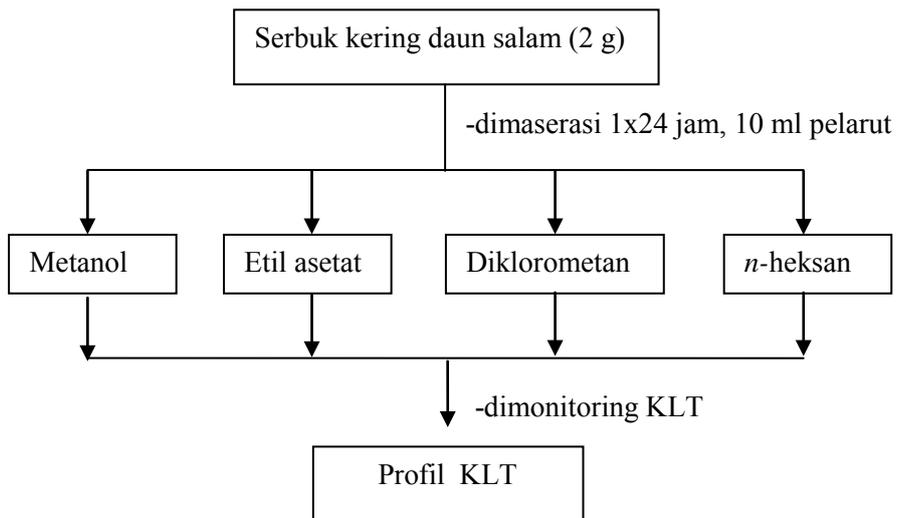
“Halaman ini sengaja dikosongkan”

LAMPIRAN A : SKEMA KERJA

1. Persiapan Bahan

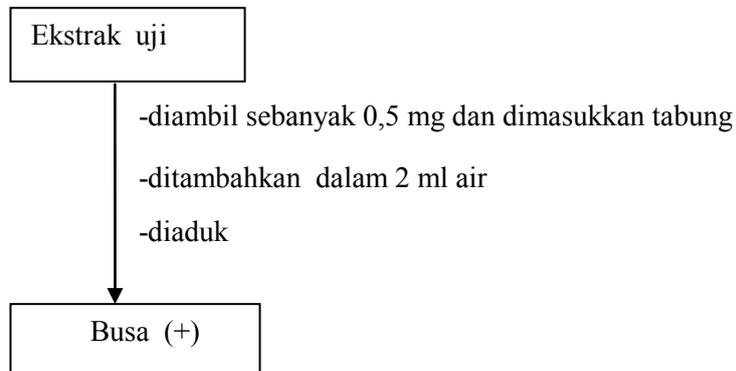


2. Uji Pendahuluan

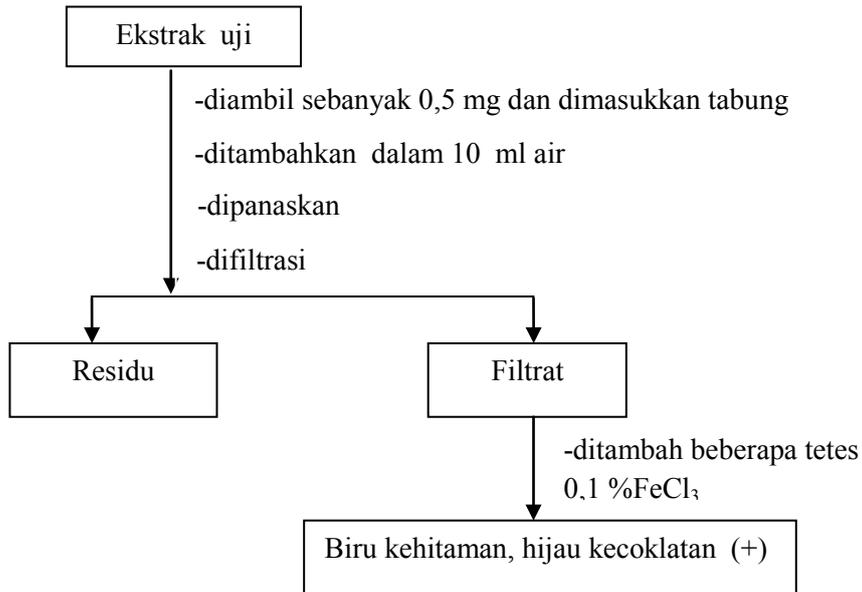


3. Uji Fitokimia

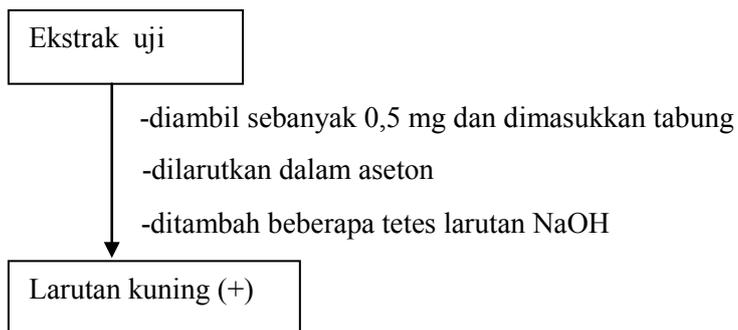
a. Uji Saponin



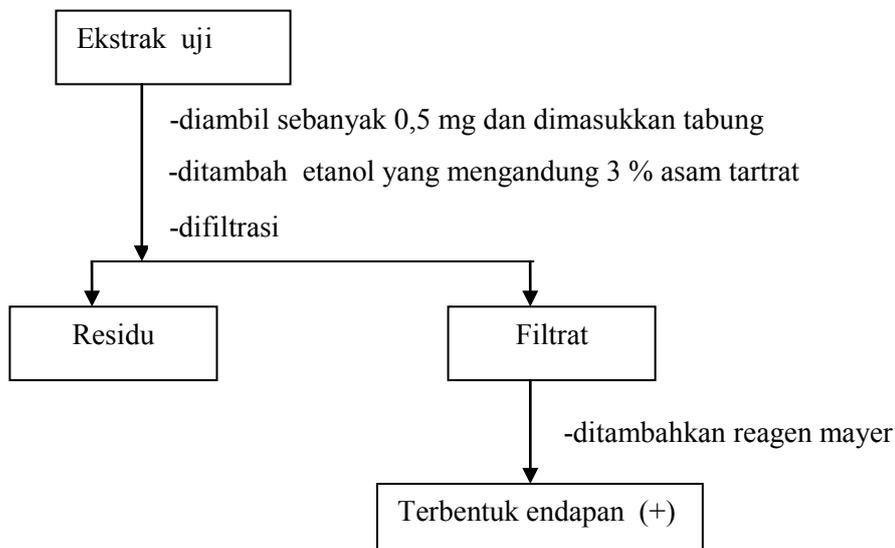
b. Uji Tanin



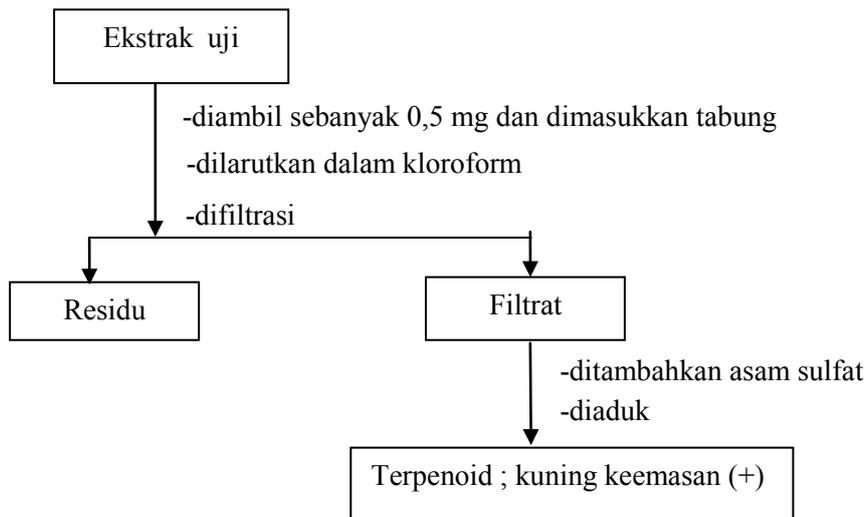
c. Uji Flavonoid



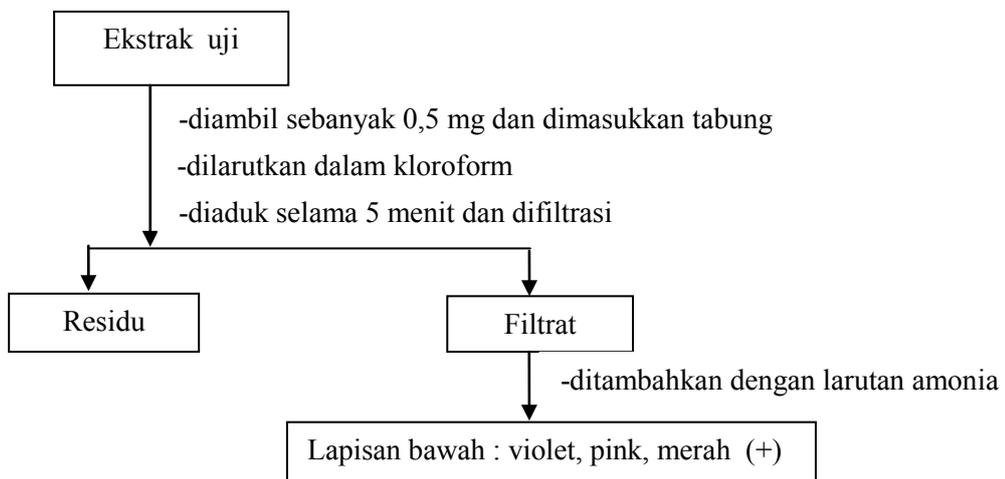
d. Uji Alkaloid



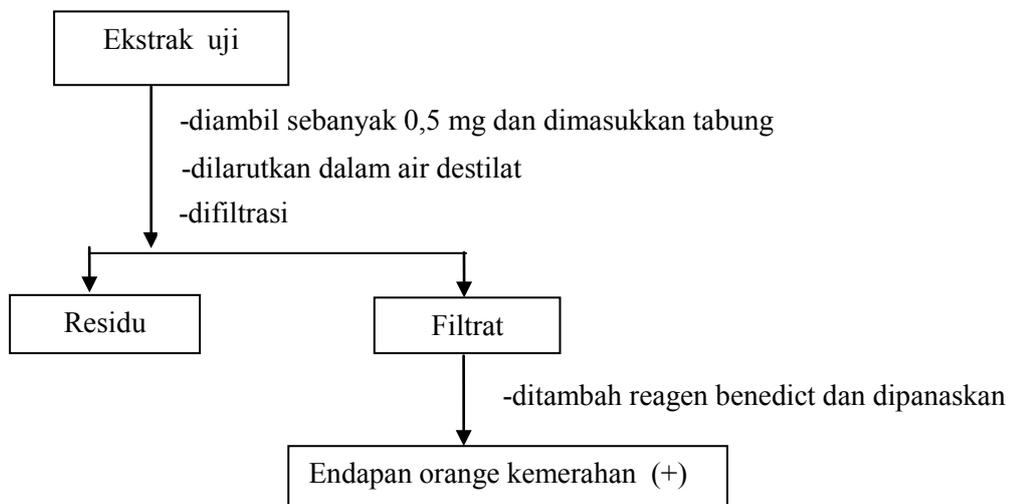
e. Uji Triterpen



f. Uji Antrakuinon

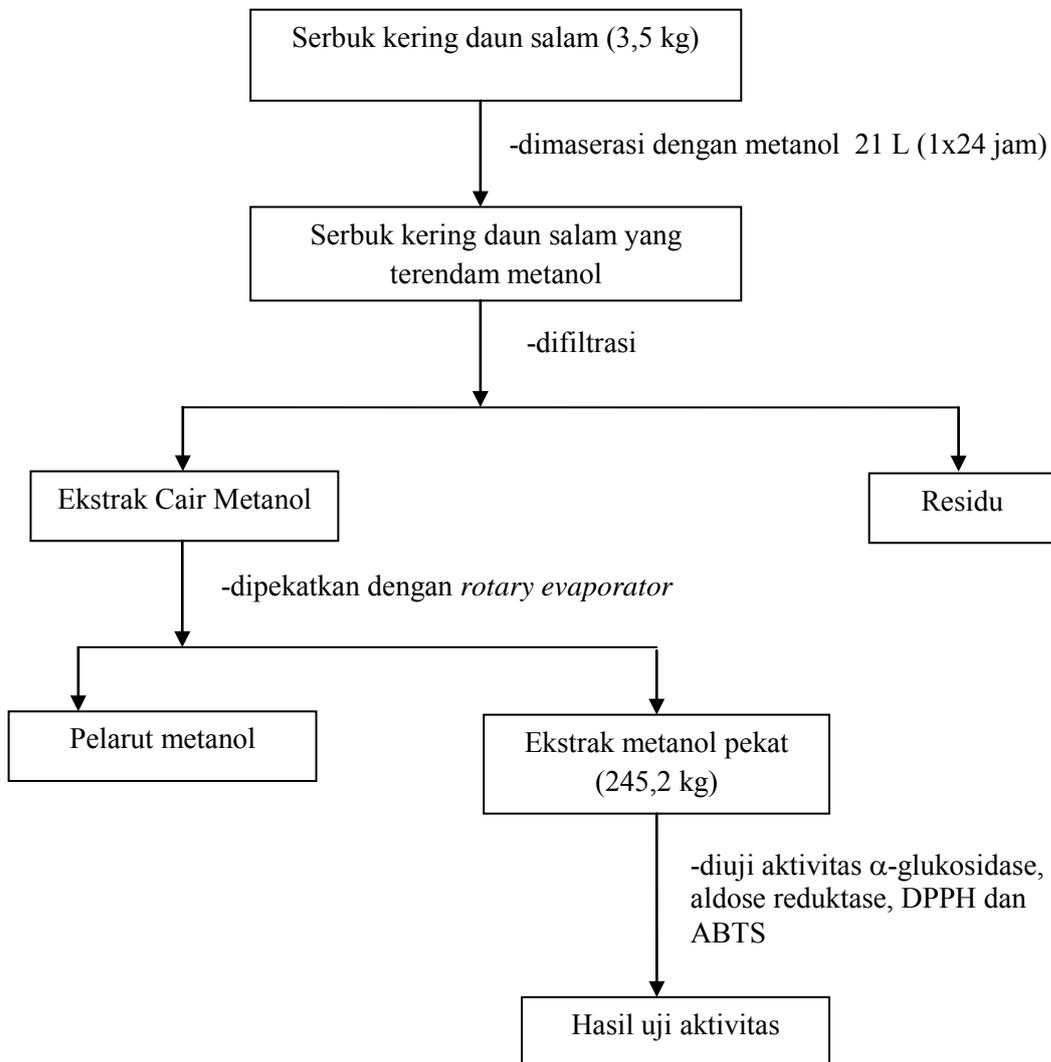


g. Uji Karbohidrat

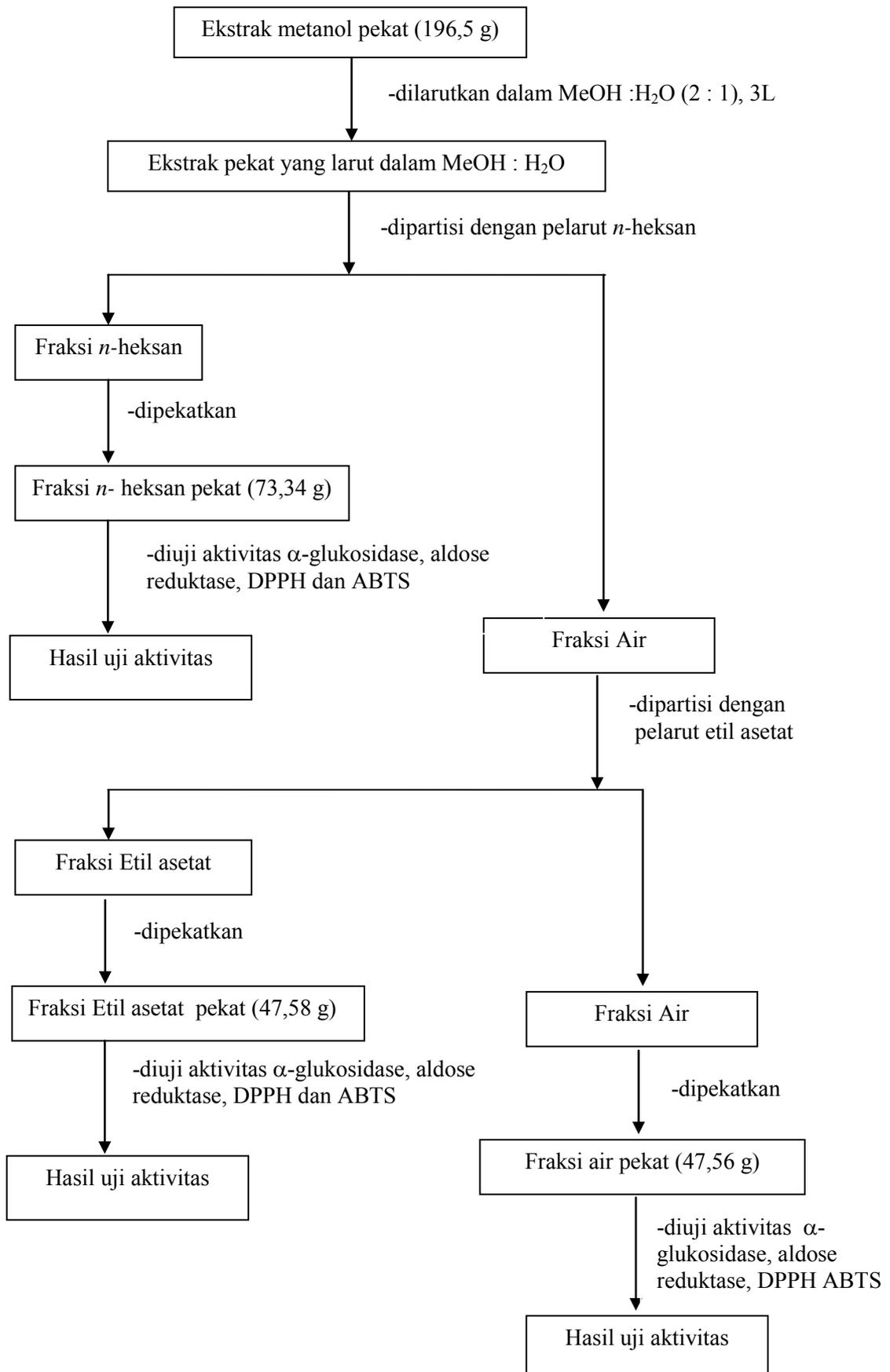


4. Isolasi Senyawa dari *S. polyanthum*

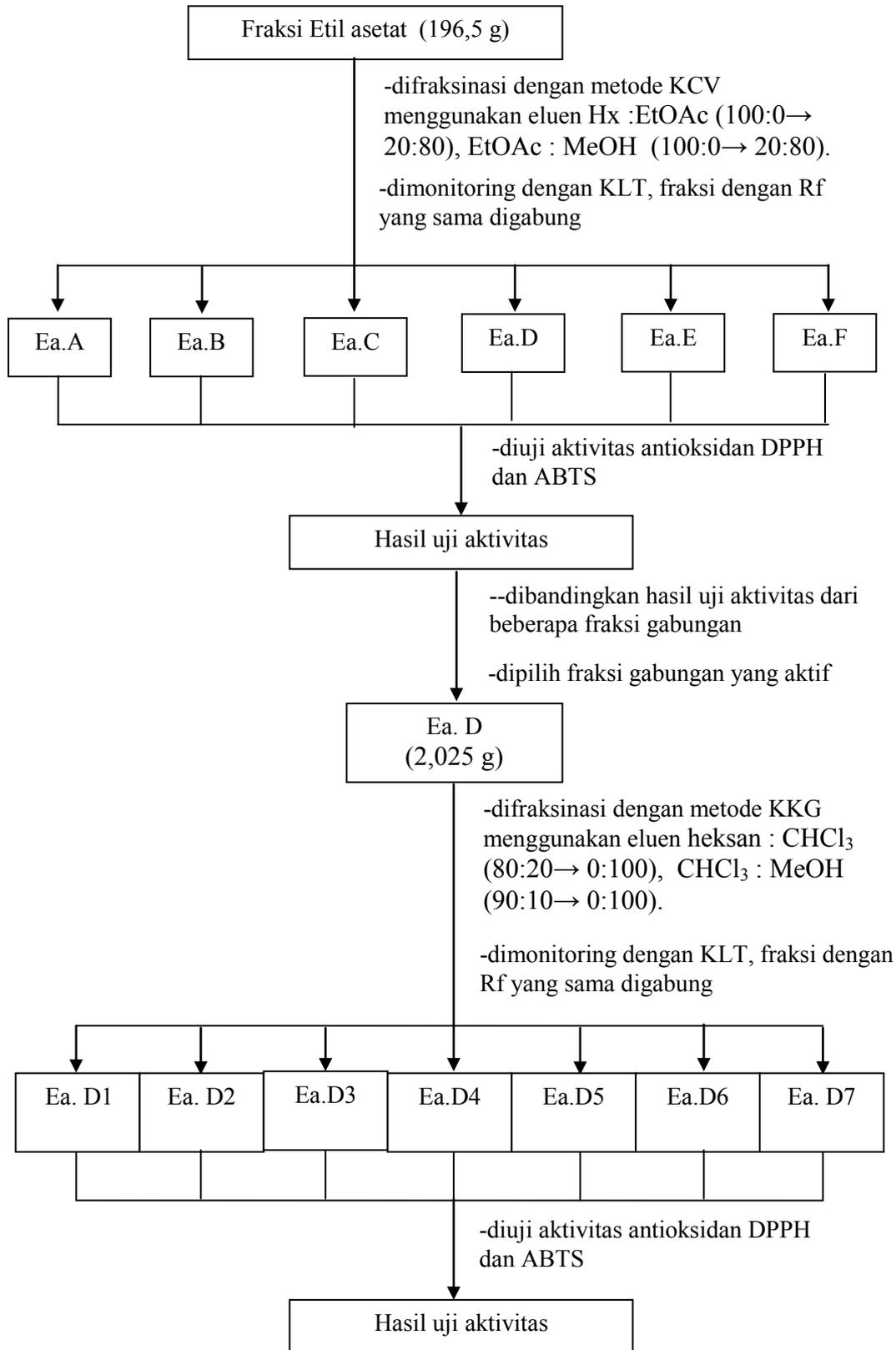
a. Ekstraksi

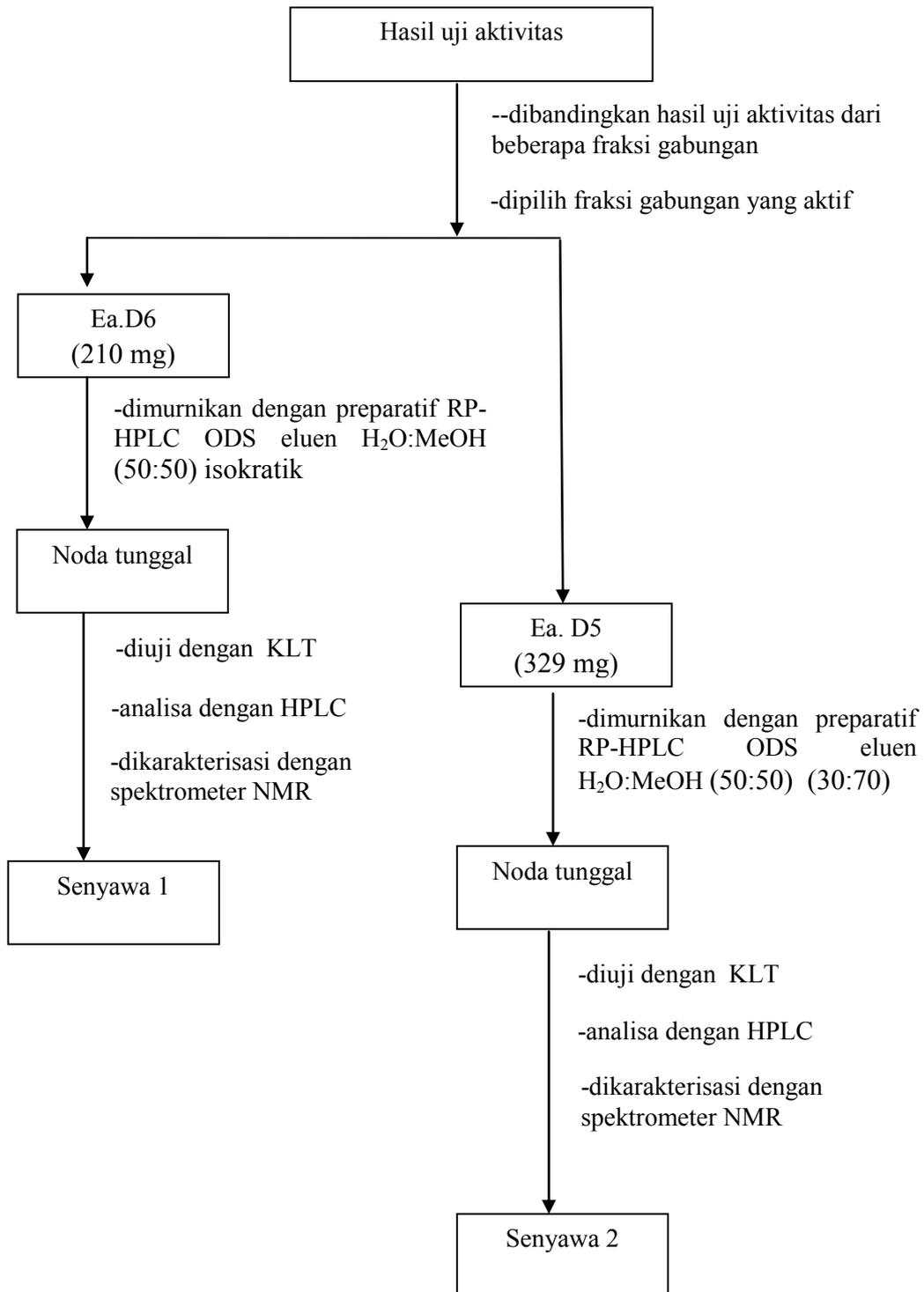


b. Partisi Cair-Cair



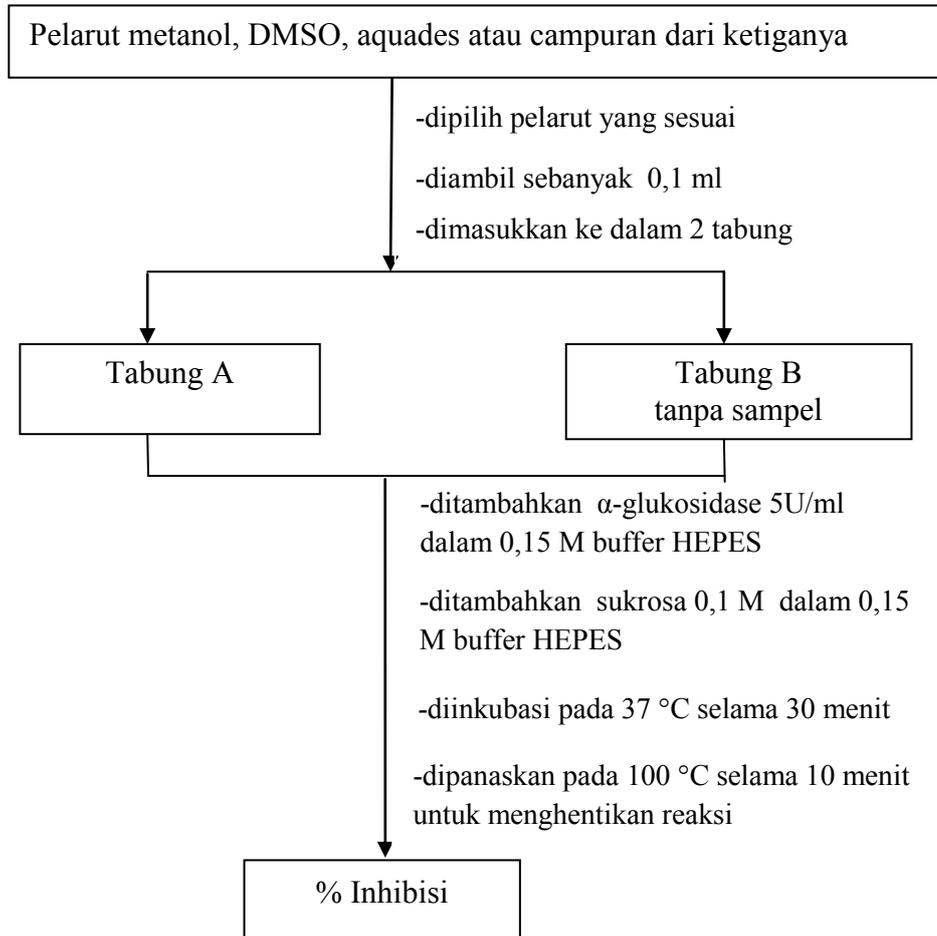
c. Fraksinasi Fraksi Etil asetat



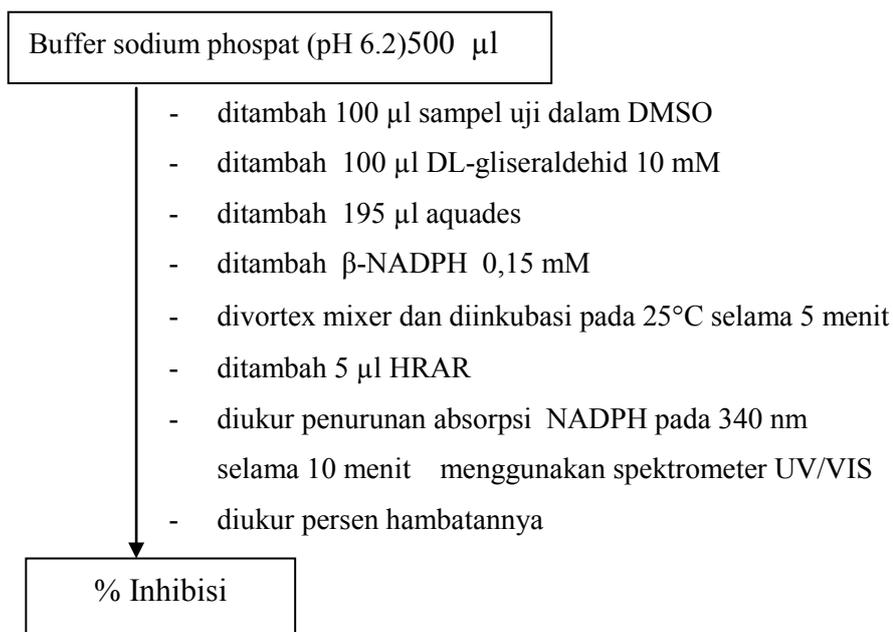


5. Uji Aktivitas Antidiabetes

a. Aktivitas Penghambatan α -glukosidase

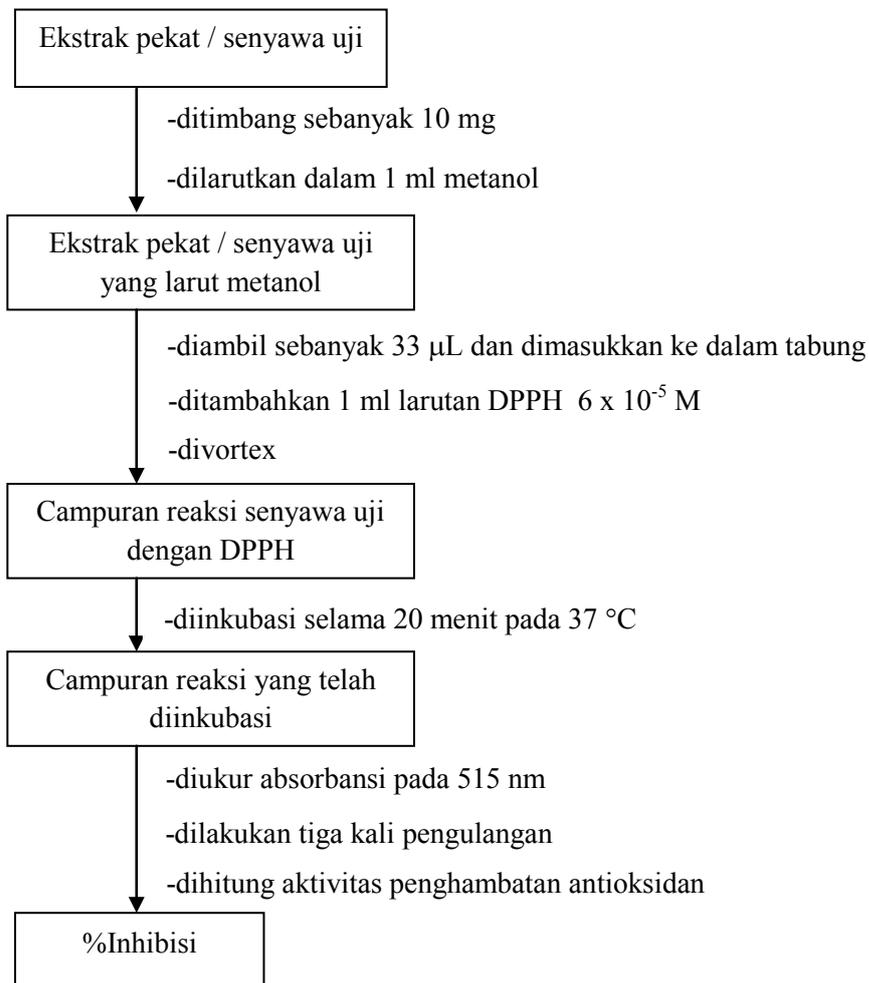


b. Aktivitas Penghambatan Aldose Reduktase

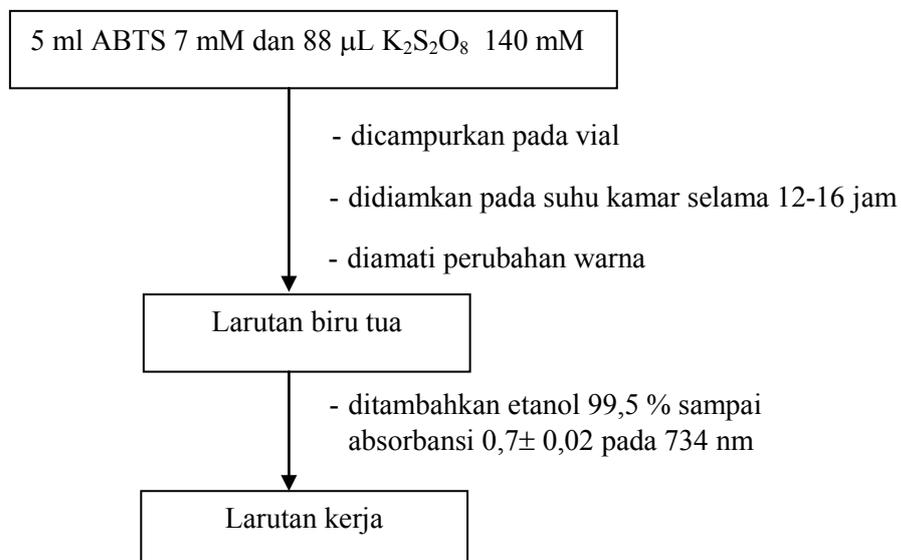


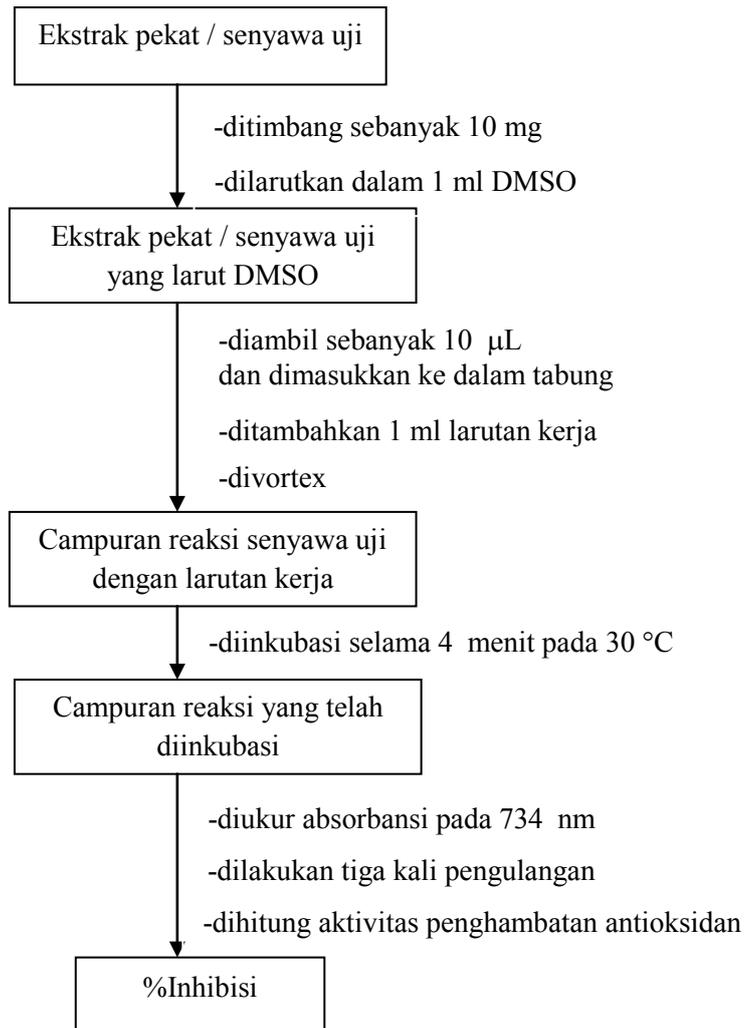
6. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Uji Penghambatan DPPH



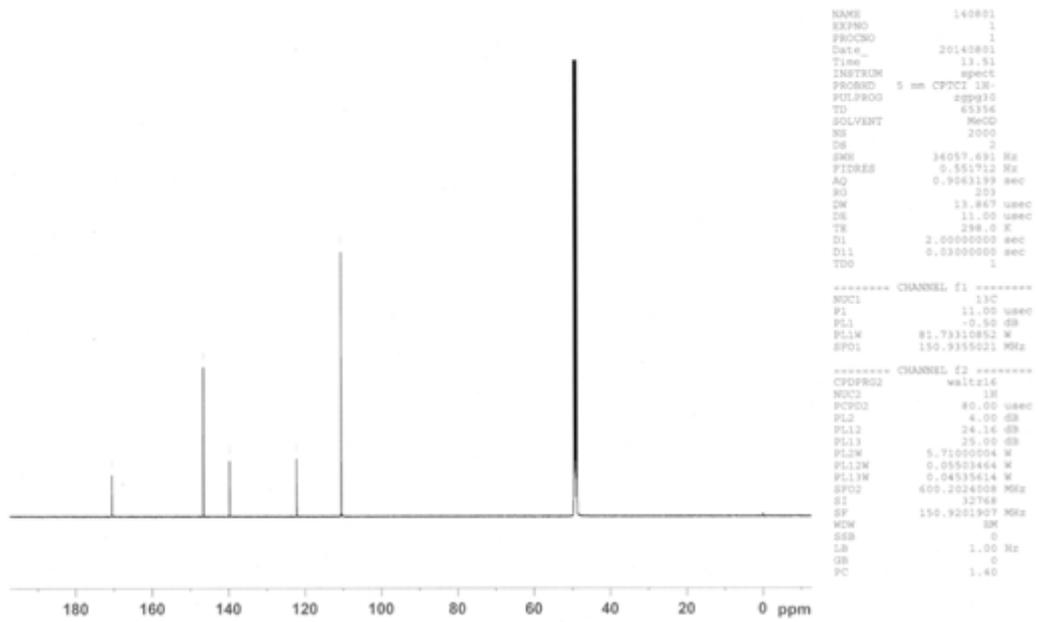
b. Uji Penghambatan ABTS



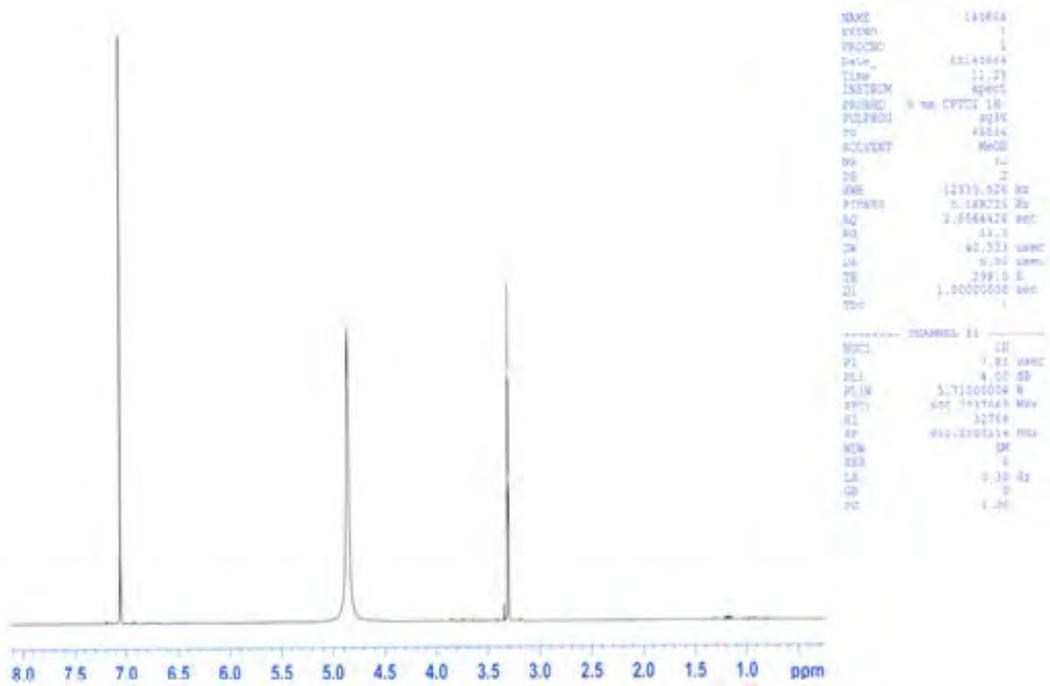


LAMPIRAN B : SPEKTRA NMR

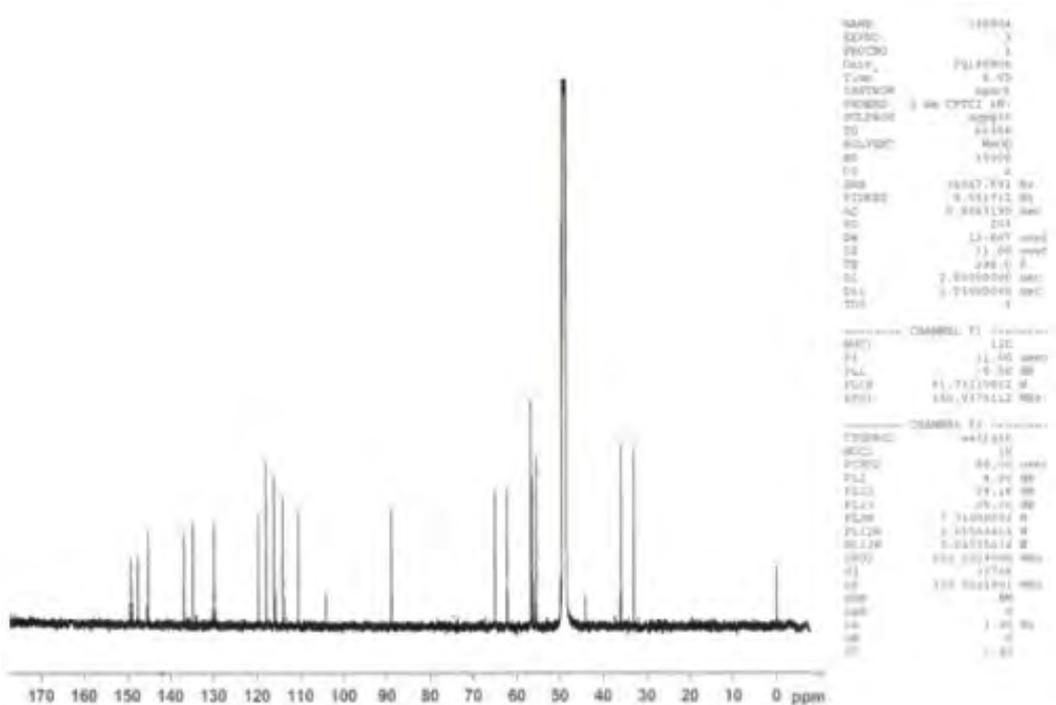
1. Spektra ^{13}C -NMR senyawa Ea.D₆



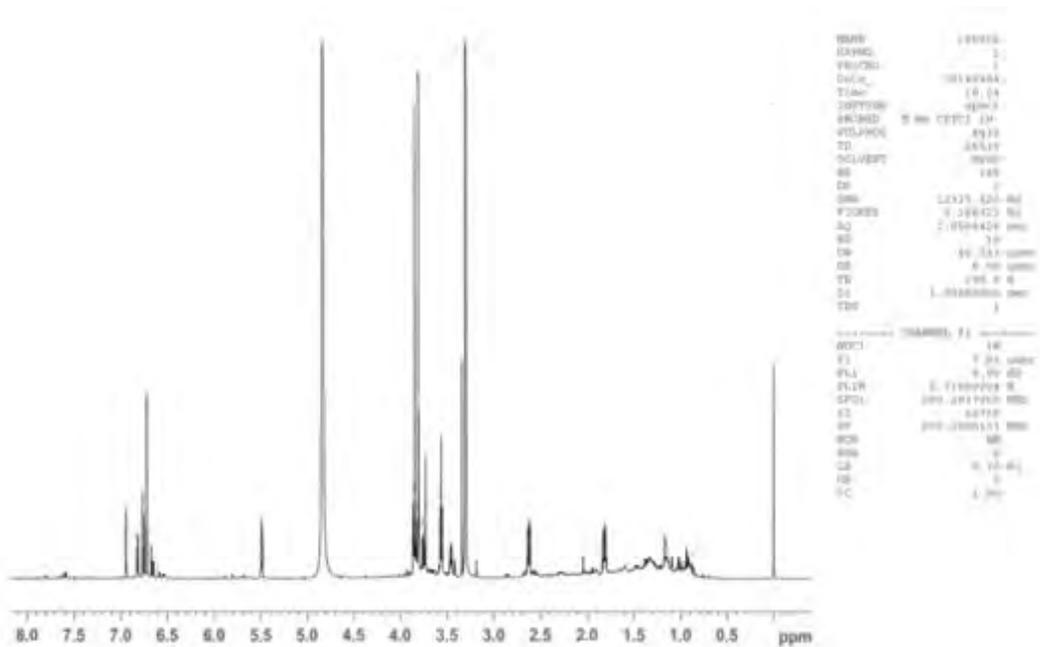
2. Spektra ^1H -NMR senyawa Ea.D₆



3. Spektra ^{13}C -NMR senyawa Ea.D₅H



4. Spektra ^1H -NMR senyawa Ea.D₅H



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul Lampiran	Halaman
A	Skema Kerja	73
	1. Persiapan Bahan	73
	2. Uji Pendahuluan	73
	3. Uji Fitokimia	73
	a. Uji Saponin	73
	b. Uji Tanin	74
	c. Uji Flavonoid	74
	d. Uji Alkaloid	74
	e. Uji Triterpen	75
	f. Uji Antrakuinon	75
	g. Uji Karbohidrat	75
	4. Isolasi Senyawa <i>S. polyanthum</i>	76
	a. Ekstraksi	76
	b. Partisi-Cair-cair	77
	c. Fraksinasi Etil asetat	78
	5. Uji Aktivitas Antidiabetes	80
	a. Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase	80
	b. Aktivitas Penghambatan Aldosa reduktase	80
	6. Uji Aktivitas Antioksidan	81
	a. Aktivitas Penghambatan DPPH	81
	b. Aktivitas Penghambatan ABTS	81
B	Spektra NMR	83
	1. Spektra ^{13}C NMR Ea.D ₆	83
	2. Spektra ^1H NMR Ea.D ₆	83
	3. Spektra ^{13}C NMR Ea.D ₅ H	84
	4. Spektra ^1H NMR Ea.D ₅ H	84

DAFTAR PUSTAKA

- Abheri, D.S., Mallick, A.R., Ghosh, A.K., (2010), Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview, *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1, (3), 185-192.
- American Diabetes Association, (2013), Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, 36, Supplement 1, s68-s69.
- Ariyanti, R., Wahyuningtyas, N., Wahyuni, A.S., (2007), Pengaruh pemberian infusa daun salam (*Eugenia polyantha* Wight) terhadap penurunan kadar asam urat darah mencit putih jantan yang diinduksi dengan potasium oksonat, *Pharmacon*, 8, (2), 56-63.
- Aiyelaagbe, O.O., Osamudiamen, P.M., (2009), Phytochemical screening for Active Compounds in *Mangifera indica* Leaves from Ibadan, Oyo state, *Plant Science Research*, 2, 1, 11-13.
- Biskup, I., Golonka I., Gamian, A., Sroka, Z., (2013), Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods, *Postepy Hig Med Dosw*, 67, 958-963.
- Braun, C., Brayer, G. D., & Withers, S. G., (1995), Mechanism-based inhibition of yeast α -glucosidase and human pancreatic α -amylase by a new class of inhibitors 2- deoxy-2,2-difluoro- α -glycosides, *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 26778–26781.
- Chethan, S., Dharmesh, S.M., Malleshi, N.G., (2009), Inhibition of aldose reductase from cataracted eye lenses by finger millet (*Eleusine coracana*) polyphenols, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 10085-10090.
- Cos, P., Hermans, N., Calomme, M., (2003), Comparative study of eight well-known polyphenolic antioxidants, *J. Pharm Pharmacol*, 55, 1291-1297.
- Dalimartha, S., (2000), *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, Jilid II, Trubus Agriwidya, Jakarta.
- Departemen Kesehatan dan Sosial RI, (2005), Pedoman Pelaksanaan Promosi Kesehatan di Daerah, Jakarta.
- Diaz, Z., Laurenzana, A., Mann, K.K., (2007), Trolox enhances the anti-lymphoma effects of arsenic trioxide, while protecting against liver toxicity, *Leukemia*, 21, 2117-2127.
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woilez, M., Merillon, J.M., (2009), Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD

- and ORAC assays, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, (5), 1768-1774.
- Fowler, M.J., (2008), Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes, *Clinical Diabetes*, 26, (2), 77-82.
- Hakamata, W., Kuihara, M., Okuda, H. Nishio, T., Oku, T., (2009), Design and Screening Strategies for α -Glucosidase Inhibitors Based on Enzymological Information, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9, 3-12.
- Halder, A.B., Crabbe, M.J., (1984), Bovine lens aldehyde reductase (aldose reductase), *Biochem Journal*, 219, 33-39.
- Har, L.W., Shaari, K., Boon, L.H., Kamarulzaman, F.A., Ismail, I.S., (2012), Two New Phloroglucinol Derivatives and Five Photosensitizing Pheophorbides from *Syzygium polyanthum* Leaves (Salam), *Natural Product Communication*, 7, (8), 1033-1036.
- Har, L.W., Ismail, I.S., (2012), Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoids of *Syzygium polyanthum* Wight Walp Leaves, *Int.J.Med.Arom. Plants Sci*, 2, (2), 219-228.
- Hardjoosudirdjo, W., (1991), *Kimia Organik untuk Universitas*, FMIPA UGM, Yogyakarta.
- Hart, H., (1983), *Organic Chemistry A Short Course*, Sixth edition, Houghton Mifflin Company, Boston.
- Han, Q. H., Wang, D.M., Cheng, Z.B., Yang, X., Xu, X.J., Wang, J., Yin, S., (2012), Chemical constituent from the leaves and twigs of *Syzygium tetragonum* Wall, *Biochemical Systematics and Ecology*, 41, 3-5.
- Hyun, T.K., Eom, S.H., Kim, J.S., (2014), Molecular docking studies for discovery of plant derived α -glucosidase inhibitors, *Plant Omics Journal*, 7, 3, 166-170.
- International Diabetes Federation, (2013), *Diabetes Atlas*, Six Edition, pp 11, IDF Publication.
- Ismiyati., Nurrochmad, A., (2013), Aktivitas antihipertensi ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight] Walp) pada tikus wistar, profil kromatografi lapis tipis serta penetapan kandungan fenolik total dan flavonoid totalnya, Tesis, UGM, Yogyakarta.
- Kato, E., Nakagomi, R., Maria, D.P.T, Puteri, G., Kawabata, J., (2012), Identification of hydroxychavicol and its dimers, the lipase inhibitors contained in the Indonesian spice, *Eugenia polyantha*, *Journal of Food Chemistry*, 136, 1239-1242.

- Kenkel, J., (2002), *Analytical Chemistry for Technicians*, 3th. Edition., CRC Press, U.S.A.
- Kealey, D and Haines, P.J., (2002), *Instant Notes: Analytical Chemistry*, BIOS Scientific Publishers Limited, New York
- Khan, A., Safdar, M., (2003), Role of Diet, Nutrients, Spices and Natural Product in Diabetes Mellitus, *Pakistan Journal of Nutrition*, 2,(1),1-12.
- Kim, K.Y., Nama, K.A., Kurihara, H., Kim, S.M., (2008), Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*, *Phytochemistry*, 69, 2820–2825.
- Kumalaningsih, S., (2006), Antioksidan alami penangkal radikal bebas, Trubus agrisarana, Surabaya.
- Kusuma, I.W., Kuspradini, H., Arung, E. T., Aryani, F., Min, Y.H., Kim, J.S., Kim, Y.U., (2011), Biological Activity and Phytochemical Analysis of Three Indonesian Medicinal Plants, *Murraya koenigii*, *Syzygium polyanthum* and *Zingiber purpurea*, *J Acupunct Meridian Stud*, 4, (1), 75–79.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., Kurniadi, B., (2008), *Buku Ajar Fitokimia*, Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia-FMIPA, UNAIR, Airlangga University Press, Surabaya.
- Lelono, R.A.A., Tachibana, S, Itoh, K., (2009), In vitro antioxidative activities and polyphenol content of *Eugenia polyantha* Wight grown in Indonesia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12,(24), 1564-1570.
- Lelono, R.A.A., Tachibana, S., (2013), Preliminary Studies of Indonesian *Eugenia polyantha* Leaf Extract as Inhibitors of Key Enzymes for Type 2 Diabetes, *J.Med.Sci*, 13, (2),103-110.
- Logendra, S., Ribnicky, D.M., Yang, H., Poulev, A., Ma, J., Kennely, E.J., Raskin, I., (2006), Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from *Artemisia dracunculoides*, *Phytochemistry*, 67, 1539-1546.
- Lorenzati, B., Zucco, C., Miglietta, S., Lamberti, F., Bruno, G., (2010), Oral Hypoglycemic Drugs : Pathophysiological Basis of Their Mechanism of Action, *Pharmaceuticals*, 3, 3005-3020.
- Makheswari, U., Sudarsanam, (2012), A Review on Bio Informatics for Diabetic Mellitus, *International Journal of Pharma Science and Research*, 3,(6), 389-395.

- Malik, A., Ahmad, A.R., (2013), Antidiarrheal Activity of Ethanolic Extract of Bay Leaves (*Syzygium polyanthum* wight), *Int. Res. J. Pharm*, 4, (4), 106-108.
- Manaharan, T., Appleton, D., Cheng, H.M., Palanisamy, U.D., (2012), Flavonoids isolated from *Syzygium aqueum* leaf extract as potential antihyperglycaemic agents, *Journal of food chemistry*, 132, 1802-1807.
- Mulja, M., Suharman, 1995, Analisis Instrumental. Airlangga University Press, Surabaya hal. 26-71, 114-136.
- Munson, J.W., (1981), *Pharmaceutical Analysis: Modern Methods*, Part A and B, diterjemahkan oleh Harjana dan Soemadi, Airlangga University Press, Surabaya.
- Nguyen, D.M.C., Dong, J.S., Hyang, B.L., In, S.K., Kil, Y.K., (2011), Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*, *Microbial Pathogenesis*, 56, 8-15.
- Nishimura, C., Yamaoka, T., Mitzutani, M., Yamashita, K., Akera, T., Tanimoto, T., (1991), Purification and characterization of the recombinant human aldose reductase expressed in baculovirus system, *Biochim Biophys Acta*, 1078, 171-178.
- Noveriza, R., Miftakhurohmah, (2010), Efektivitas ekstrak metanol daun salam (*Eugenia polyantha*) dan daun jeruk purut (*Cytrus hirtus*) sebagai antijamur pada pertumbuhan *Fusarium oxysporum*, *Jurnal Littri*, 16, (1), 6-11.
- Nuratmi, B., Winarno, M.W., Sundari, S., (1999), Khasiat daun salam (*Eugenia polyantha*) sebagai antidiare pada tikus putih, *Media Litbangkes, Obat Asli Indonesia*, 8, 3-4.
- Nuttall, S.L., Dunne, F., Kendal M.J., Martin, U., (1999), Age-independent oxidative stress in elderly patients with non-insulin dependent diabetes mellitus, *Q. J. Med*, 92, 8-33.
- Otsuka, H., Hirata, E., Shinzato, T., Takeda, Y., (2000), Isolation of Lignan Glucosidase and Neolignan Sulfate from the Leaves of *Glochidion zeylanicum* (Gaertn) A.Juss, *Chem.Pharm.Bull*, 48, (7), 1084-1086.
- Pavia, D.L., Lampman, G. M., Knitz, G.S., (1995), *Introduction to Organic Laboratory Techniques a Microscale Approach*, Second edition, Saunders College Publishing, New York.
- Pellegrini, R. Re. N., Proteggente, A., Yang, P.M., Evans, C. R., (1999), Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation

- decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 9-10, 1231-1237.
- Pischke, M.A., (2001), Diabetic Ketoacidosis, Case Study, *Physician Assistant*, 25, (11), 42-48.
- Poole, C.F., Salwa, K., (1991), *Chromatography Today*, Elsevier Science Publisher, Amsterdamm.
- Rahbani, N.M.E., Rahimi, P.A., Rahbani, N.M., Adi, B.F., Mirhashemi, S.M., (1999), Total antioxidant capacity, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in diabetic patients, *Medical Journal of Islamic Academy of Science*, 12, (4), 14-109.
- Rajendra, C.E., Magadam, G.s., Nadaf, M.A., Yashoda, S.V., Manjula, M., (2011), Phytochemical screening of The Rhizome of *Kaempferia Galanga*, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 3, (3), 61-63.
- Roy, J.G., (1991), *Pengantar Kromatografi*, Edisi Kedua, Penerbit ITB, Bandung.
- Siswandono., Soekardjo, B., (2011), Kimia Medisinal, Edisi Kedua, Airlangga University Press, Surabaya.
- Studiawan, H., Santosa, M.H., (2005), Uji Aktivitas Penurunan Kadar Glukosa Darah Ekstrak Daun *Eugenia polyantha* pada Mencit yang Diinduksi Alokstan, *Media Kedokteran Hewan*, 21, (2), 62-65.
- Sultana, B.F., Anwar., Pryzbylski, R., (2007), Antioxidant activity of phenolic component present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica* and *Eugenia jambolana* Lam. Trees. *Food Chem.*, 104, 1106-1114.
- Tanaka, T., Orii, Y., Nanaka, G.I., Nishioka, I., Kouno, I., (1996), Syzyginins A and B, two ellagitannins from *Syzygium aromaticum*, *Phytochemistry*, 43, (6), 1345-1348.
- Tian, L.W., Xu, M., Wang, D., Zhu, H.T., Yang, C.R., Z, Y.J., (2011), Phenolic constituents from the leaves of *Syzygium forrestii* Merr and Perry, *Biochemical Systematic and Ecology*, 39, 156-158.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H., (2012), Phytochemical screening and extraction : A Review, *International Pharmaceutica Scientia*, 1, (1), 98-106.

- Ueeda, E., Yoshikawa, Y., Sakurai, H., Kojima, Y., Kajiwara, N.M., (2005), In vitro α -glucosidase Inhibitory Effect of Zn (II) complex with 6-methyl -2 picolinmethyলামida, *Chem. Pharm. Bull*, 53, 451-452.
- Ueno, Y., Kizaki, M., Nakagiri, R., Kamiya, T., Sumi, H., Osawa, T., (2002), Dietary glutathione protect rats from diabetic nephopathy and neuropathy, *J. Nutr*, 132, 897-900.
- Van De Laar, F.A., (2012), Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes, *Vascular Health and Risk Management*, 4 (6), 1189-1195.
- Venkataratnam, K., Venkataraju, R.R., (2008), In Vitro Antimicrobial Screening of the Fruit Extracts of Two *Syzygium* Species (Myrtaceae), *Biological Research*, 2, (1-2), 17-20.
- Victoria, F.N., Lenardo, E.J., Savegnago. L., Perin, G., Jacob R.G., Alves, D., Silva, W.P.D., Motta, A.D.S.D.,Nascente, P.D.S., (2012), Essential oil the leaves of *Eugenia uniflora* L:Antioxidant and antimicrobial properties, *Food and Chemical Toxicology*, 20, 2668-2674.
- Wonorahardjo, Suryani., (2013), Metode-Metode Pemisahan Kimia Sebuah Pengantar, Akademia Permata, Jakarta.
- Yoshikawa, K., Tani,S., Baba, C., Hashimoto, T., (2013), Phenylpropanoid, Saponin A, Lignan and Neolignan Saponosides, Saponosides A and B, Isolated from Canadian Sugar Maple Sap, *Molecules*, 18, 9641-9649.
- Zhongbing, L., Guangjun, N., Belton,P., Tang, H., Zhao, B., (2012),Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives, *Neurochemistry International*, 48, 263 - 274.
- Zurowska, D.M., Wenta, W., (2012), A Comparison of abts and dpph methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk, *Acta Sci.Ol., Technol.Aliment*, 11, (1), 83-89.

BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di kota Surabaya, pada tanggal 11 Februari 1990, dengan nama lengkap Mutia Devi Hidayati. Penulis merupakan anak tunggal dari pasangan Drs. Sunhaji (Alm) dan Hermiati. Penulis menempuh pendidikan formal di TK ABA 40 Surabaya (1994-1995), SD Muhammadiyah 11 Surabaya (1996-2002), SMPN 3 Surabaya (2003-2005), SMAN 1 Surabaya (2006-2008) dan S1 Kimia Fakultas MIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember (Tahun 2006-2010). Penulis menyelesaikan studi S1 di bidang Kimia Organik Bahan Alam. Penulis diterima sebagai mahasiswa S2 Bidang Keahlian Kimia Hayati di Institut Teknologi Sepuluh Nopember pada semester Ganjil 2012/2013 dan mengambil bidang Kimia Organik Bahan Alam sebagai bidang minat untuk menyelesaikan jenjang S-2. Penulis pernah menjadi visiting researcher di Kyushu University pada bulan Juni-September 2014.