



TESIS SK-142502

**SENYAWA FENOLAT DAN GLIKOSIDA DARI
KULIT BATANG MIMBA (*Azadirachta indica*)
ASAL PULAU POTERAN**

WAHYU NUGROHO
NRP. 1412 201 006

DOSEN PEMBIMBING
Prof. Mardi Santoso, Ph.D
Prof. Dr. Taslim Ersam

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



THESIS SK-142502

**PHENOLIC AND GLYCOSIDE COMPOUNDS OF
MIMBA (*Azadirachta indica*) STEM BARK
FROM POTERAN ISLAND**

WAHYU NUGROHO
NRP. 1412 201 006

SUPERVISORS
Prof. Mardi Santoso, Ph.D
Prof. Dr. Taslim Ersam

PROGRAM OF MAGISTER
ORGANIC CHEMISTRY
CHEMISTRY DEPARTMENT
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2015

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

Oleh:
WAHYU NUGROHO
NRP. 1412 201 006

Tanggal Ujian : 13 Juli 2015
Periode Wisuda : September 2015

Disetujui Oleh:

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

(Pembimbing I)

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

(Pembimbing II)

3. Prof. Dr. R. Y. Perry Burhan, M.Sc
NIP. 19590215 198701 1 001

(Penguji)

4. Hamzah Fansuri, M.Si., Ph.D
NIP. 19691017 199412 1 001

(Penguji)

5. Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D
NIP. 19800724 200812 1 002

(Penguji)

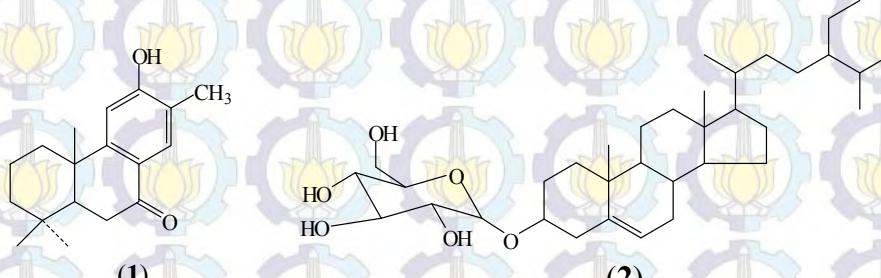


Senyawa Fenolat dan Glikosida dari Kulit Batang Mimba (*Azadirachta indica*) Asal Pulau Poteran

Nama Mahasiswa : Wahyu Nugroho
NRP : 1412 201 006
Dosen Pembimbing : Prof. Mardi Santoso, Ph.D
Prof. Dr. Taslim Ersam

ABSTRAK

Senyawa fenolat diterpenoid, nimbiol (**1**), dan senyawa glikosida terpenoid, β -sitosterol-3-*O*-glikosida (**2**) telah berhasil diisolasi dari ekstrak metanol kulit batang *Azadirachta indica*. Kedua senyawa tersebut difraksinasi menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV) dan dielusidasi struktur menggunakan spektroskopi infra merah dan *Nuclear Magnetic Resonance*. Ekstrak metanol dan nimbiol (**1**) memiliki aktivitas inhibisi terhadap enzim α -glukosidase yang lebih lemah dibandingkan akarbosa (**48**), sedangkan senyawa (**2**) bersifat tidak aktif.



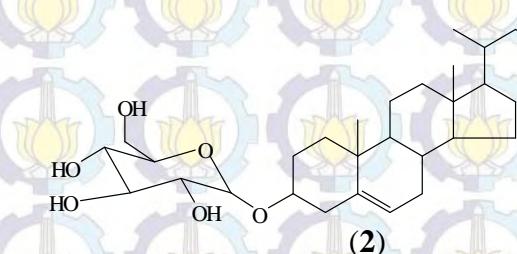
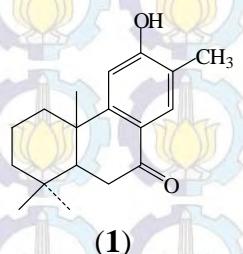
Kata kunci: *Azadirachta indica*, fenolat, glikosida, α -glukosidase

Phenolic and Glycoside Compounds of Mimba (*Azadirachta indica*) Stem Bark from Poteran Island

Name : Wahyu Nugroho
Student Identity Number : 1412 201 006
Supervisor : Prof. Mardi Santoso, Ph.D
Prof. Dr. Taslim Ersam

ABSTRACT

A diterpenoid phenolic, nimbiol (**1**), and a terpenoid glycoside, β -sitosterol-3-O-glycoside (**2**) had been isolated from methanol extract of *Azadirachta indica* stem bark. The two compounds were obtained by fractionation using vacuum liquid chromatography method and the structures were elucidated by *Infra Red* and *Nuclear Magnetig Resonance* spectroscopy. Methanol extract and nimbiol (**1**) has lower inhibition activity of α -glycosidase enzyme compare with acarbose (**48**), meanwhile compound (**2**) was inactive.



Keywords: *Azadirachta indica*, phenolic, glycoside, α -glycosidase

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan naskah Tesis yang berjudul “Senyawa Fenolat dan Glikosida dari Kulit Batang Mimba (*Azadirachta indica*) Asal Pulau Poteran” dengan baik dan lancar.

Penulis dapat menyelesaikan tesis ini berkat bantuan, dukungan dan dorongan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Bapak Prof. Mardi Santoso, Ph.D dan Prof. Dr Taslim Ersam selaku dosen pembimbing yang telah memberikan waktu, arahan, bimbingan, pemahaman, ilmu dan segala diskusi selama proses penelitian tesis ini.
2. Bapak Hamzah Fanzuri, Ph.D selaku ketua jurusan Kimia ITS dan seluruh jajaran Bapak/Ibu dosen atas segala dedikasinya dan ilmu yang telah diberikan.
3. Kedua orang tua, keluarga dan orang-orang terdekat yang selalu memberikan dukungan dan doa.
4. Teman-teman satu tim dalam Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Sintesis dan angkatan 2012 Magister Kimia ITS yang telah memberikan dukungan, semangat dan menjadi rekan yang baik dalam berdiskusi.
5. Pak Bambang selaku penyuluh pertanian di Pulau Poteran atas bantuannya dalam memperoleh sampel kulit batang Mimba.
6. Semua pihak yang telah membantu proses penyusunan tesis.

Penulis menyadari bahwa naskah ini masih terdapat kekurangan, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran yang membangun guna tercapainya perbaikan penulisan tesis.

Surabaya, Juli 2015

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	5
1.3 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Tinjauan Tumbuhan Mimba (<i>Azadirachta indica</i>)	7
2.1.1 Klasifikasi Taksonomi	7
2.1.2 Kandungan Fitokimia	7
2.1.3 Kegunaan	9
2.2 Diabetes Mellitus (DM)	10
2.3 Enzim α -Glukosidase	11
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN	15
3.1 Alat danBahan	15
3.1.1 Alat	15
3.1.2 Bahan	15
3.2 Prosedur Kerja	15
3.2.1 Persiapan Sampel	15
3.2.2 Isolasi Senyawa-senyawa dari <i>A. indica</i>	15
3.3 Uji Aktivitas Inhibisi α -Glukosidase	16

BAB 4	HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1	Ekstraksi Senyawa-senyawa dari Kulit Batang <i>A.indica</i>	19
4.2	Fraksinasi Ekstrak Metanol	20
4.2.1	Elusidasi Struktur Senyawa (1)	24
4.2.2	Elusidasi Struktur Senyawa (2)	32
4.3	Uji Aktivitas Inhibisi α -Glukosidase	34
BAB 5	KESIMPULAN DAN SARAN	39
5.1	Kesimpulan	39
5.2	Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	41	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Reaksi Inhibisi Enzim α -Glukosidase	13
Gambar 4.1 Kromatogram Hasil Uji Pendahuluan	19
Gambar 4.2 Kromatogram Hasil Fraksinasi I Ekstrak Metanol.....	20
Gambar 4.3 Kromatogram Hasil KCV Fraksi B	21
Gambar 4.4 Kromatogram Gabungan Fraksi B	21
Gambar 4.5 Hasil Uji Kemurnian Senyawa (1)	22
Gambar 4.6 Kromatogram Hasil Fraksinasi II Ekstrak Metanol	22
Gambar 4.7 Kromatogram Fraksi Gabungan D, E, dan F	23
Gambar 4.8 Hasil Uji Kemurnian Senyawa (2)	24
Gambar 4.9 Spektrum IR Senyawa (1)	24
Gambar 4.10 Korelasi HMBC Parsial I dari Senyawa (1)	27
Gambar 4.11 Korelasi HMBC Parsial II dari Senyawa (1).....	28
Gambar 4.12 Korelasi HMBC Parsial III dari Senyawa (1)	29
Gambar 4.13 Korelasi HMBC Parsial IV dari Senyawa (1)	31
Gambar 4.14 Korelasi HMBC Gabungan dan Struktur yang disarankan untuk Senyawa (1)	32
Gambar 4.15 Spektrum IR Senyawa (2)	33
Gambar 4.16 Aktivitas Inhibisi Ekstrak Metanol dan Akarbosa (48).....	35
Gambar 4.17 Aktivitas Inhibisi Senyawa (1), (2), dan Akarbosa (48)	36

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Data Spektrum ^{13}C -NMR Nimbosodion (46), Sugiol (47) dan Nimbion (36)	9
Tabel 4.1 Data Hasil Analisa DEPT dan HMQC Senyawa (1).....	26
Tabel 4.2 Data Korelasi HMBC Senyawa (1).....	26
Tabel 4.3 Perbandingan Data Pergeseran Kimia ^1H -NMR dari Senyawa (2) dan β -Sitosterol-3- <i>O</i> -glikosida.....	33
Tabel A.1 Nilai % Inhibisi Ekstrak Metanol.....	48
Tabel A.2 Nilai % Inhibisi Standar Akarbosa (48)	48
Tabel A.3 Nilai % Inhibisi Senyawa (1)	49
Tabel A.4 Nilai % Inhibisi Senyawa (2)	49
Tabel A.5 Nilai % Inhibisi Standar Akarbosa (48)	49

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN A. Skema Kerja	45
LAMPIRAN B. Spektrum NMR	50

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sustainable Island Development Initiative (SIDI) merupakan program kerjasama yang digagas oleh ITS, Kementerian Kelautan dan Perikanan, dan Wismar University. Program ini bertujuan untuk memberdayakan masyarakat lokal Indonesia berbasis pemanfaatan secara optimal potensi sumber daya alam yang terdapat di pulau terluar sehingga terwujud kemandirian, peningkatan kesejahteraan masyarakat, dan terjaganya keutuhan wilayah NKRI.

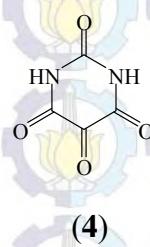
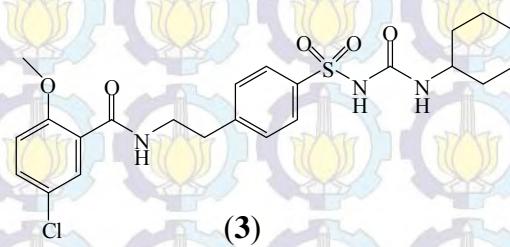
Pulau Poteran di Kabupaten Sumenep, Madura, dipilih sebagai salah satu pulau percontohan dengan berbasis pengembangan ekstrak herbal dari tumbuhan obat setempat. Pendekatan skrining senyawa fenolat telah dilakukan untuk memilih spesies tumbuhan lokal yang potensial sebagai sumber pengobatan herbal, dan diperoleh 10 tumbuhan dengan kandungan senyawa fenolat yang signifikan, yaitu mimba (*Azadirachta indica*), kelor (*Moringa oleifera*), kacang kayu (*Cajanus cajan*), juwet (*Syzygium cumini*), sirsak (*Annona muricata*), sukun (*Artocarpus altius*), saga (*Adenanthera pavonina*), kalak (*Poliantha lateriflora*), kesambi (*Schleichera alesa*), dan pulai (*Alstonia scholaris*).

Tumbuhan Mimba di Pulau Poteran umumnya dimanfaatkan sebagai tanaman pagar di hampir setiap pekarangan rumah warga, dan sebagai obat tradisional untuk menurunkan kadar gula darah penderita diabetes. Tumbuhan Mimba berpeluang untuk dijadikan sebagai alternatif sumber herbal dalam mengobati penyakit Diabetes Mellitus (DM). Mimba juga biasa dimanfaatkan masyarakat setempat untuk mengobati penyakit gatal-gatal dan sebagai pakan ternak terutama kambing.

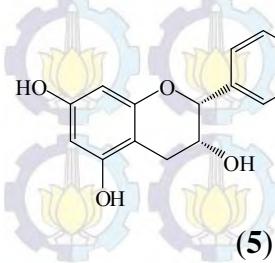
International Diabetes Federation (IDF) menyatakan bahwa pada tahun 2005 terdapat 200 juta (5,1%) penderita diabetes di dunia, dan diduga jumlah penderita pada tahun 2025 akan meningkat menjadi 333 juta (6,3 %). Negara-negara seperti India, China, Amerika Serikat, Jepang, Indonesia, Pakistan,

Bangladesh, Italia, Rusia dan Brazil merupakan 10 besar negara dengan jumlah penderita diabetes terbanyak (Depkes RI, 2005).

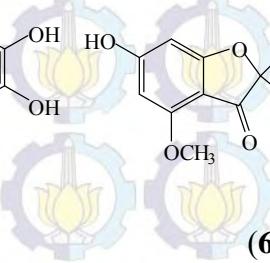
Peran ekstrak daun dan minyak biji mimba dalam menurunkan kadar gula darah mulai dikaji. Ekstrak air daun mimba terbukti dapat menurunkan kadar gula darah baik pada hewan uji yang dibuat hiperglikemik, maupun hewan uji normal (Chattopadhyay, 1999). Khosla *et al.* (2000) melaporkan efek hipoglikemik dari ekstrak air daun dan minyak biji mimba yang komparatif dengan glibenklamida (**3**) terhadap kelinci normal dan kelinci diabetes yang diinduksi aloksan (**4**), tetapi efek dari minyak biji mimba lebih lemah dibandingkan ekstrak daunnya. Priosoeryanto *et al.* (2009) melaporkan bahwa ekstrak etanol daun mimba menunjukkan efek antihiperglikemik pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan (**4**). Shori dan Baba (2011) melaporkan bahwa yogurt yang diberi ekstrak mimba memiliki potensi aktivitas anti-diabetik dan anti-hipertensi.



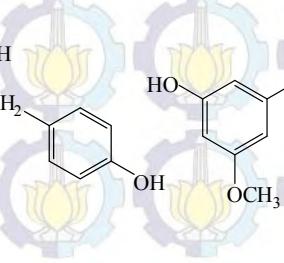
Senyawa-senyawa fenolat dan glikosida dilaporkan menunjukkan peran signifikan dalam menurunkan kadar gula darah, antara lain: epikatekin (**5**) (Sheehan *et al.*, 1983), marsupsin (**6**), pterostilben (**7**) (Manickam *et al.*, 1997; Pari dan Satheesh, 2006), asam ferulat (**8**) (Mandal *et al.*, 2008), asam protokatekuat (**9**), kuersetin (**10**), caryatin-3'-metil eter (**11**), azaleatin (**12**), caryatin-3'-metil eter-7-O- β -D-glikosida (**13**) (Abdallah *et al.*, 2011), kaempferol-3-O- β -D-glukopiranosida (**14**), kaempferol-3-O- β -D-rutinosida (**15**), rutin (**16**), asam 3,5-dikaffeoilkuinat metil ester (**17**) (Tan *et al.*, 2013), naringenin (**18**), asam kaffeat (**19**) (Bhattacharya S, 2013).



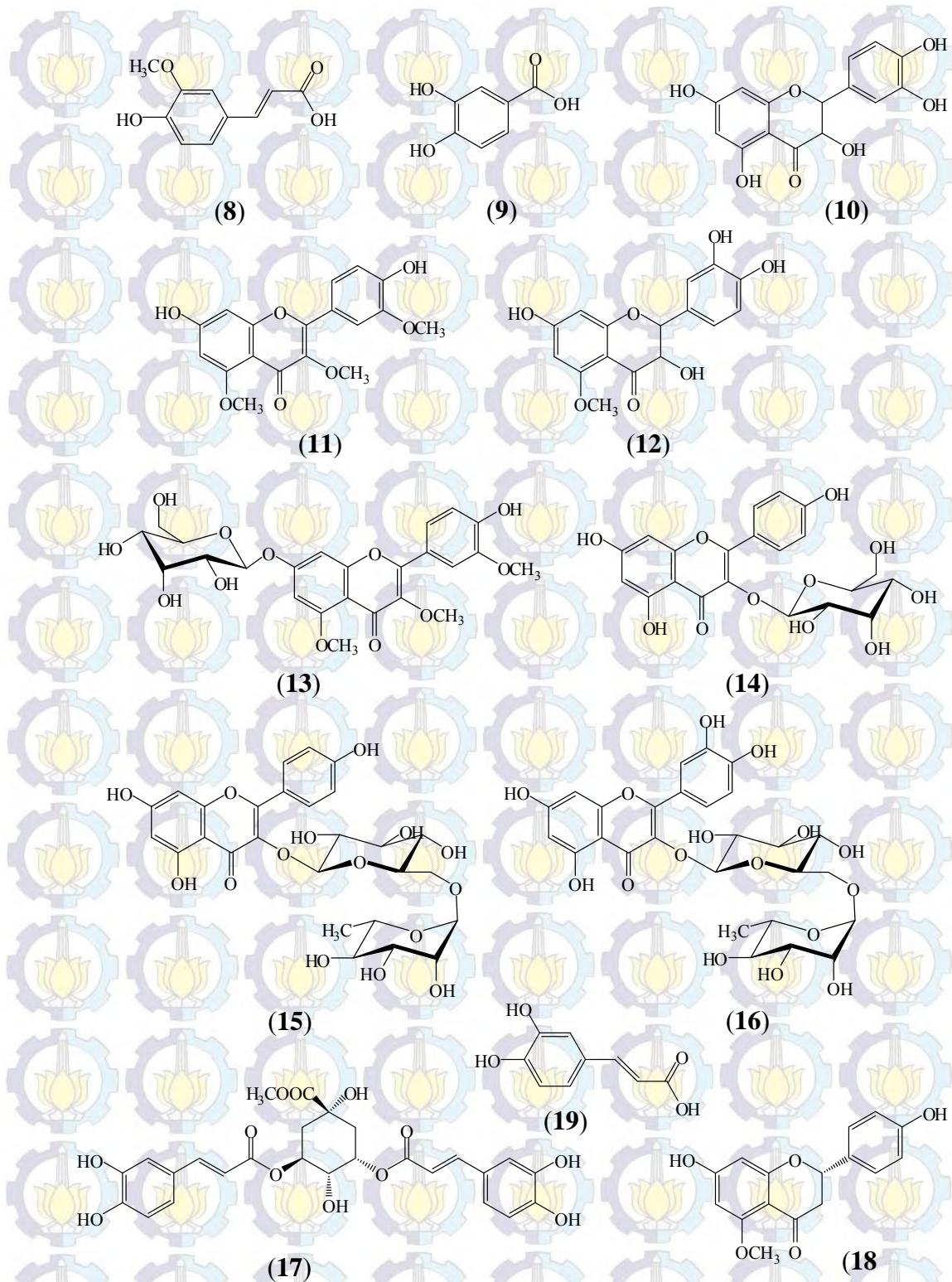
(5)



(6)

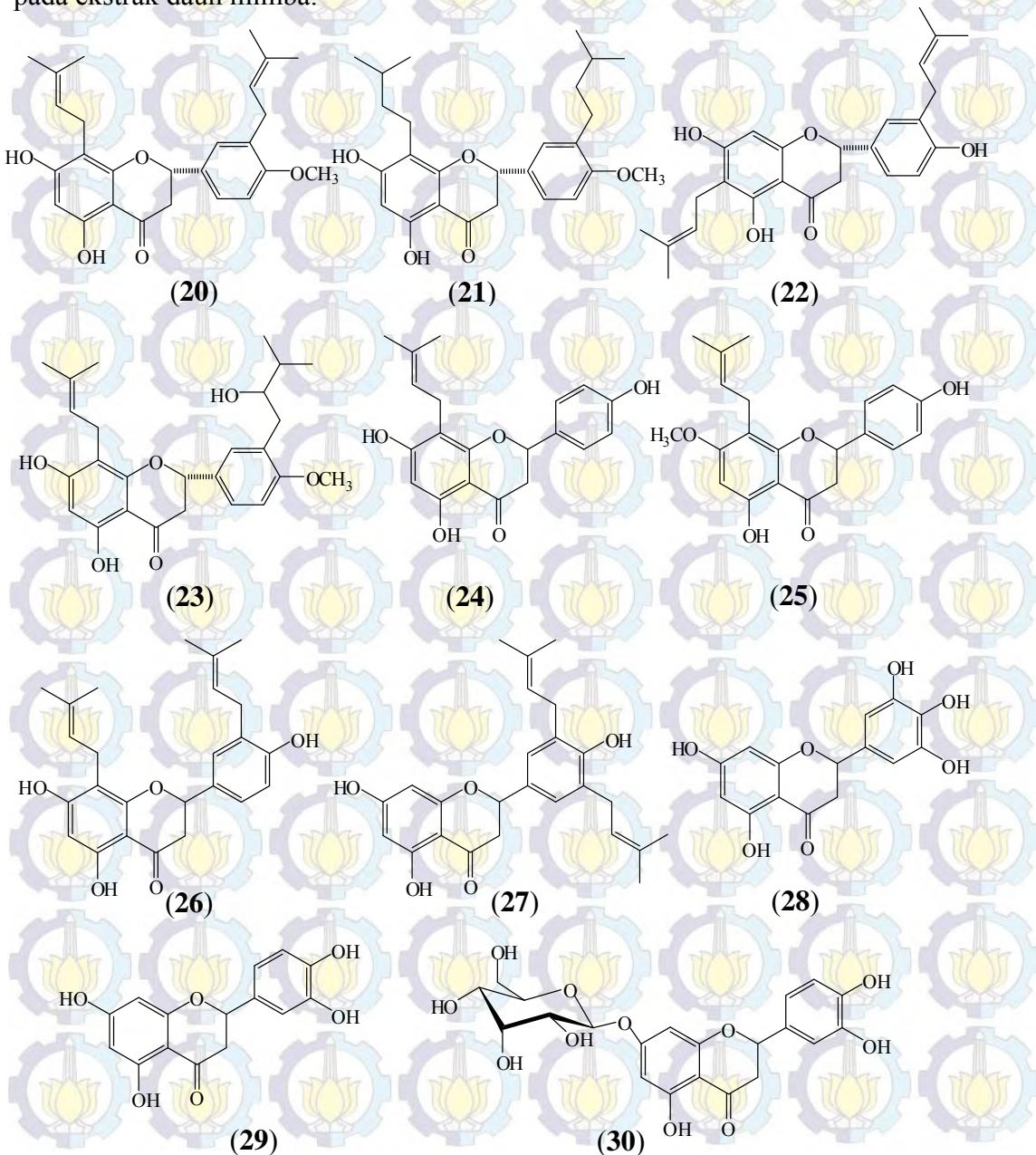


(7)

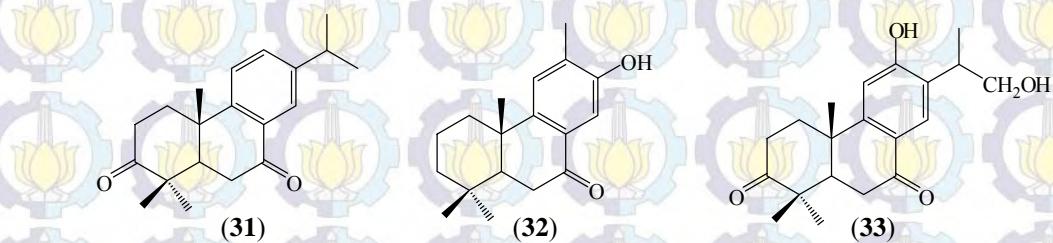


Kandungan senyawa fenolat dari *A. indica*, utamanya golongan flavonoida yang terdapat pada bagian daun, batang, dan bunga telah ditemukan. Garg dan Bhakuni (1984) melaporkan kandungan senyawa flavanon terprenilasi dari daun *A. indica*, berupa: nimbaflavon (**20**), tetrahidronimbaflavon (**21**), euchrestaflavon

(22). Balasubramanian *et al.* (1993) melaporkan senyawa 8-prenil-5,7-dihidroksi-3'-(3-hidroksi-3,3-dimethylbutil)-4'-metoksiflavanon (23) dari eksudat kelenjar resin dalam batang dan daun muda. Nakahara *et al.* (2003) melaporkan bahwa senyawa 5,7,4'-trihidroksi-8-prenilflavanon (24), 5,4'-dihidroksi-7-metoksi-8-prenilflavanon (25), 5,7,4'-trihidroksi-3',8-diprenilflavanon (26), dan 5,7,4'-trihidroksi-3',5'-diprenil-flavanon (27) ditemukan dari bagian bunga. Sari (2013) berdasarkan analisis HPLC mendeteksi kandungan asam ferulat (8), myrisetin (28), kaempferol (29), kuersetin (10), dan luteolin-7-O- β -D-glukopiranosida (30) pada ekstrak daun mimba.



Ara I (1989) melaporkan kelompok senyawa fenolat diterpenoid dengan kerangka struktur asam podokarpan dari *A.indica* asal Pakistan, antara lain senyawa nimbinon (31), margokin (32), dan margokinin (33).



Tumbuhan mimba di Pulau Poteran, selain dimanfaatkan sebagai obat tradisional dan pakan ternak, batang kayunya dimanfaatkan sebagai kayu bahan bangunan. Bagian kulit dari batang kayu umumnya menjadi limbah di tempat pengolahan kayu dan hanya digunakan sebagai kayu bakar yang memiliki nilai ekonomi rendah. Bagian ini menarik untuk dikaji karena dalam tinjauan metabolisme tumbuhan, di bagian kulit batang ini terdapat senyawa metabolit sekunder yang memiliki peran untuk melindungi bagian yang lebih dalam dari tumbuhan.

1.2 Perumusan Masalah

Memperhatikan senyawa (31), (32), dan (33) anggota kelompok senyawa fenolat diterpenoid dari *A.indica* asal Pakistan dan berdasarkan pendekatan kemotaksonomi bahwa perbedaan letak geografis dapat mempengaruhi variasi senyawa, maka rumusan masalah yang diangkat pada penelitian adalah bahwa masih berpeluang ditemukannya senyawa anggota kelompok fenolat diterpenoid dari kulit batang *A.indica* asal Pulau Poteran dengan variasi struktur berbeda dengan yang sudah dilaporkan dan bagaimana tingkat keaktifan senyawa-senyawa tersebut dalam menurunkan kadar gula darah melalui pengujian aktivitas inhibisi terhadap enzim α -glukosidase?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian bertujuan untuk memperoleh senyawa fenolat diterpenoid dari kulit batang *A. Indica* asal Pulau Poteran dan mengkaji aktivitas inhibisi senyawa-senyawa hasil isolasi terhadap enzim α -glukosidase.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian dapat mengungkap kandungan senyawa fitokimia yang terdapat dalam kulit batang mimba (*A. indica*), sehingga mampu menjadi nilai tambah tumbuhan, yang pada akhirnya mampu meningkatkan nilai ekonomi dan berdampak positif terhadap kesejahteraan masyarakat lokal di Pulau Poteran.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tumbuhan Mimba (*Azadirachta indica*)

Mimba telah dimanfaatkan sebagai obat sejak lebih dari 5000 tahun yang lalu dan tercantum dalam Ayurveda; yang dalam bahasa Sansekerta disebut sebagai “nimba” berasal dari kata “nimbati ivasthyamdadati” yang berarti “neem, to give good health”. Mimba dipercaya berasal dari Assam dan Burma di Asia Selatan, tetapi asal tumbuhan juga dilaporkan berasal dari Pakistan, Srilanka, Thailand, Malaysia, dan Indonesia (National Research Council, 1992).

2.1.1 Klasifikasi Taksonomi

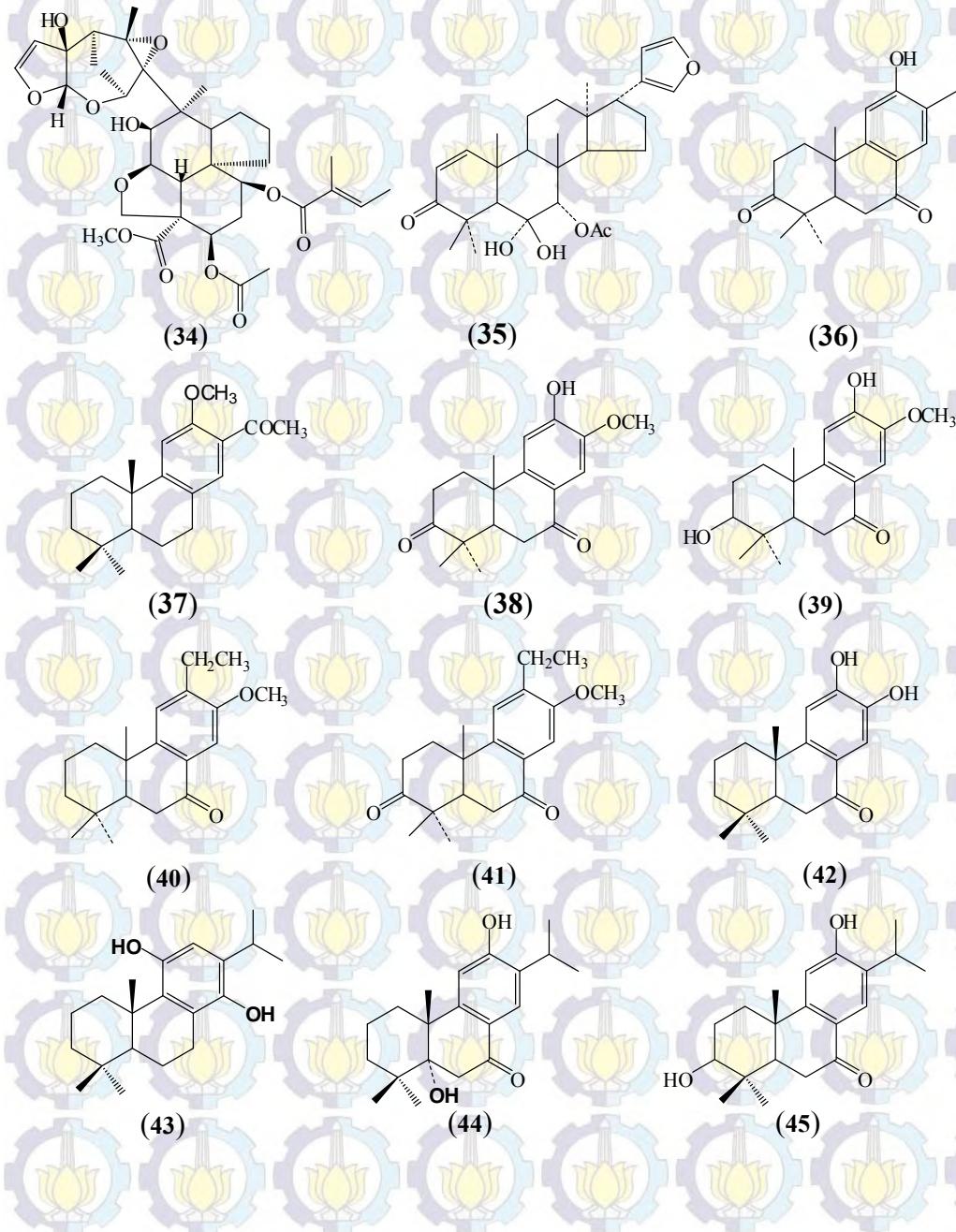
Sistematika tumbuhan mimba (*A. indica*) menurut De Jussieu (1830) dalam Biswas *et al.* (2002) adalah sebagai berikut:

Divisi	:	Spermatophyta
Subdivisi	:	Angiospermae
Kelas	:	Dicotyledonae
Subkelas	:	Sympetalae
Bangsa	:	Rutales
Suku	:	Meliaceae
Famili	:	Melieae
Marga	:	<i>Azadirachta</i>
Jenis	:	<i>Azadirachta indica</i>

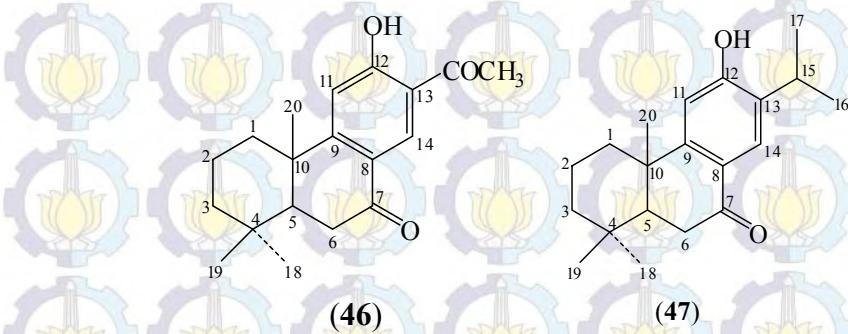
2.1.2 Kandungan Fitokimia

Soegihardjo (2007) melaporkan terdapat lebih dari 140 senyawa fitokimia yang telah berhasil diisolasi dari berbagai bagian tumbuhan mimba. Tumbuhan mengandung terpenoida, gliserida, polisakarida, senyawa sulfur, fenolat seperti flavonoid dan glikosidanya, asam amino, senyawa alifatik. Azadirachtin (34), merupakan senyawa terpopuler dari tumbuhan ini, dan diketahui berperan aktif sebagai antiinsektisida. Senyawa terpenoid fenolik yang telah ditemukan antara

lain: nimokinol (**35**) pada daun (Siddiqui *et al.*, 1984), nimbion (**36**) dan nimboson (**37**) pada kulit batang (Ara *et al.*, 1988), nimbionon (**38**) dan nimbionol (**39**) pada kulit batang, yang menunjukkan aktivitas antibakterial (Siddiqui *et al.*, 1988), nimbonon (**40**) dan nimbolonon (**41**) pada bagian ranting kayu (Ara *et al.*, 1989). Senyawa terpenoid yang telah diisolasi dari bagian akar tumbuhan *A. Indica*, adalah nimbidiol (**42**) (Majumder *et al.* 1987), nimbosidin (**43**), nimolinin (**44**), margokilin (**45**) (Ara I, 1989).



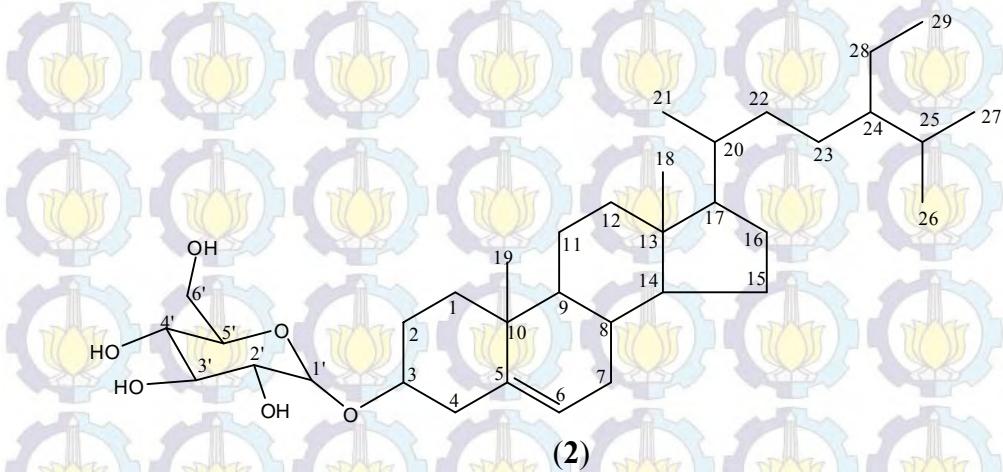
Data spektrum ^{13}C -NMR dari senyawa kelompok diterpen trisiklik podokarpan; nimbosodion (**46**), sugiol (**47**), dan nimbion (**36**) yang telah berhasil diisolasi dari kulit batang *A.indica* (Ara I, 1989).



Tabel 2.1 Data Spektrum ^{13}C -NMR Nimbosodion (**46**), Sugiol (**47**) dan Nimbion (**36**)

Posisi	δ_{C} (ppm)		
	46	47	36
1	37,8	37,3	37,3
2	18,9	18,4	34,6
3	41,3	40,9	214,8
4	33,3	32,7	47,3
5	49,5	49,1	49,5
6	36,0	35,4	37,4
7	198,6	199,2	197,1
8	157,0	122,4	123,4
9	159,0	156,3	154,1
10	33,3	37,4	37,1
11	109,6	109,0	109,9
12	159,1	160,3	131,5
13	157,4	133,0	160,3
14	130,7	125,6	130,8
15	-	26,1	-
16	-	21,8	-
17	-	20,7	-
18	15,1	20,7	25,3
19	23,2	31,9	28,6
20	21,3	22,5	21,0
Ar-CH ₃	-	-	15,3
COCH ₃	32,5	-	-
COCH ₃	198,6	-	-

Salah satu senyawa glikosida yang dilaporkan telah diisolasi dari kulit batang *A. indica* adalah senyawa β - sitosterol-3-O-glikosida (2) (Ara I, 1989). Data spektrum ^{13}C -NMR dari senyawa ini adalah sebagai berikut, δ_{C} (ppm): 38,2; 27,9; 77,9; 39,8; 140,7; 122,6; 32,0; 32,1; 50,1; 37,1; 21,1; 39,8; 42,4; 56,8; 24,4; 28,3; 56,2; 11,9; 19,1; 36,7; 18,8; 34,1; 26,3; 46,0; 29,1; 19,3; 19,8; 23,2; 11,9 untuk kerangka terpenoid secara berurutan, dan 104,3; 75,6; 76,6; 73,5; 79,2; 61,1 untuk gugus gikosidanya (Pei-Wu *et al.*, 1988).



2.1.3 Kegunaan

Mimba biasa digunakan sebagai obat cacing di Pakistan (Jabbar *et al.*, 2006), obat malaria (Omar *et al.*, 2003; Benoit *et al.*, 1996), untuk kesehatan mulut di Nigeria (Bukar *et al.*, 2004), obat demam (Ajaiyeoba *et al.*, 2003), obat jerawat (Jain dan Basal, 2003), pengusir nyamuk (Wandscheer *et al.*, 2004), antifungal (Fabry *et al.*, 1996), antiskabies (Charles dan Charles, 1992), antifertilitas (Khillare dan Shrivastav, 2003; Mishra and Singh, 2005), imunomodulator (Labadie *et al.*, 1989).

2.2 Diabetes Mellitus (DM)

American Diabetes Association (ADA) (2005) menyebutkan bahwa DM merupakan suatu kelompok penyakit metabolismik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya. Hiperglikemia kronik pada diabetes berhubungan dengan kerusakan jangka panjang, disfungsi dan kegagalan beberapa organ tubuh terutama mata,

ginjal, syaraf, jantung, dan pembuluh darah (Soegondo, 2009). WHO (2006) menyebutkan kriteria seseorang yang didiagnosa menderita DM jika kadar glukosa darah saat puasa ≥ 126 mg/dL dan setelah makan ≥ 200 mg/dL.

Gejala yang ditimbulkan DM antara lain poliurea (banyak mengeluarkan urin), polidipsi (haus terus menerus), berat badan berkurang dengan cepat, polifagia (banyak makan), hiperglikemia, glukosuria, ketosis, gatal-gatal, penglihatan kabur, gairah seks menurun, luka sukar sembuh, cepat lelah, kesemutan pada jari tangan dan kaki, dan pada wanita hamil dapat menyebabkan bobot bayi di atas 4 kg. Dampak lain penyakit ini adalah kerusakan pada mata, syaraf, jantung, dan pembuluh darah. Faktor yang menyebabkan terjadinya diabetes antara lain keturunan, obesitas, pola makan tidak sehat, malnutrisi, gangguan toleransi glukosa, dan lingkungan. (Soegondo, 2009).

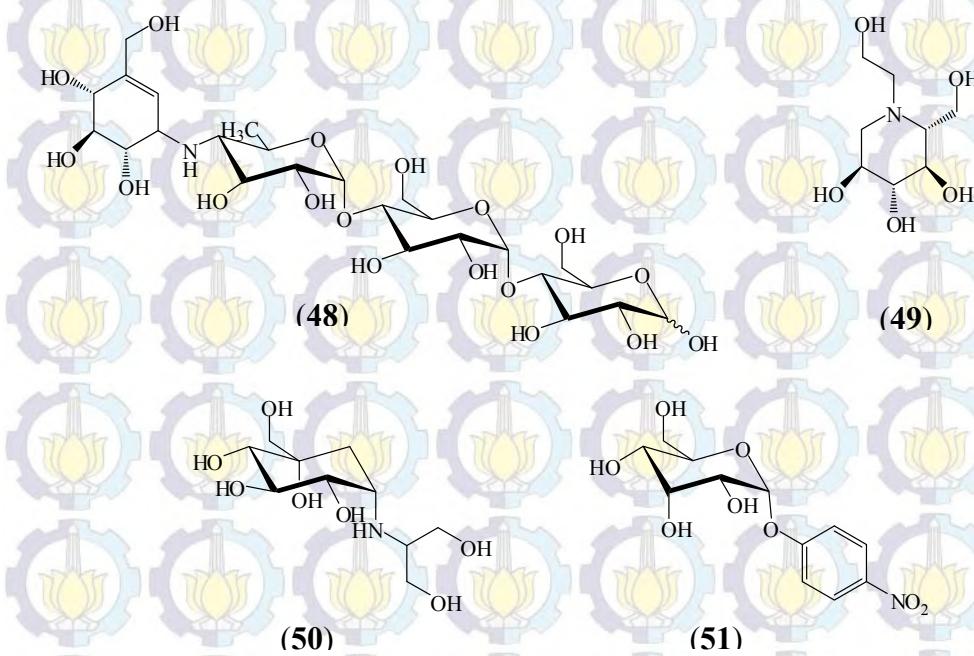
ADA (2005) mengklasifikasi DM : DM tipe I, DM tipe II, DM kehamilan, dan DM tipe lainnya, tetapi secara umum yang dikenal adalah DM tipe I dan DM tipe II. Penderita DM tipe I mengalami kerusakan sel pankreas yang menghasilkan insulin, akibatnya sel-sel β pankreas tidak dapat mensekresikan insulin atau hanya dapat mensekresikan insulin dalam jumlah sedikit. Kerusakan pada sel-sel β pankreas disebabkan oleh peradangan pada pankreas. Akibat sel-sel β pankreas tidak dapat membentuk insulin atau insulin hanya ada dalam jumlah sedikit maka penderita diabetes tipe I ini selalu bergantung pada insulin. Pengobatan DM tipe I dilakukan dengan pemberian insulin kepada penderita. Penderita DM tipe II tidak mengalami kerusakan sel-sel β pankreas tetapi insulin yang disekresikan jumlahnya menurun. Penurunan tersebut disertai defisiensi insulin hingga resistensi insulin. DM tipe II umumnya disebabkan oleh obesitas atau kelebihan berat badan. Pengobatan DM tipe II dilakukan dengan pengaturan pola makan dan olah raga, tetapi dapat pula diobati dengan obat-obat antidiabetes.

2.3 Enzim α -Glukosidase

Enzim α -glukosidase atau dengan nama lain α -D-glukosida glukohidrolase (EC 3.2.1.20) merupakan enzim yang berperan dalam sel usus halus mamalia. Enzim tersebut merupakan enzim kunci pada proses akhir pemecahan karbohidrat.

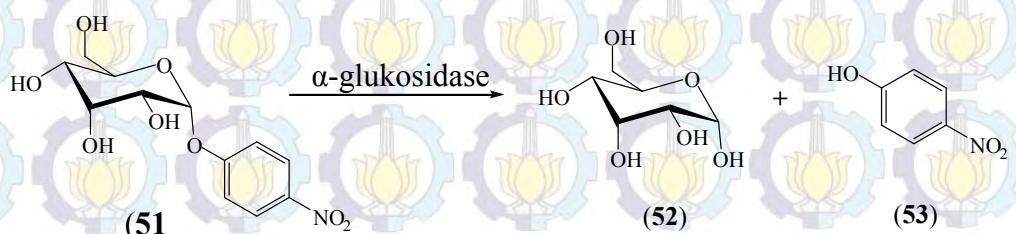
Enzim α -glukosidase mengkatalisis hidrolisis terminal residu glukosa non pereduksi yang berikatan α -1,4 pada berbagai substrat dan dihasilkan α -D-glukosa. α -Glukosidase menghidrolisis ikatan α -glikosidik pada oligosakarida dan α -D-glikosida (Gao *et al.*, 2007).

Fungsi α -glukosidase dalam sistem pencernaan di usus sebagai katalis tahap terakhir dalam proses pemecahan karbohidrat. Kerja enzim α -glukosidase dalam proses penyerapan makanan di usus pada kondisi diabetes harus dicegah. Kadar glukosa dalam darah penderita diabetes akan semakin tinggi akibat banyaknya pemecahan karbohidrat menjadi glukosa. Kerja enzim tersebut dalam usus harus dihambat, baik dengan obat alami maupun obat komersial (Murray *et al.*, 2009). Penghambatan enzim α -glukosidase dapat menggunakan akarbosa (48), miglitol (49), dan voglibosa (50) yang diketahui mampu mengurangi hiperglikemia setelah makan melalui penghambatan kerja enzim pencerna karbohidrat dan menunda absorpsi glukosa (Hsieh *et al.*, 2010). Penggunaan obat ini biasa digunakan untuk penyakit DM tipe 2.



Pengujian aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dapat dilakukan dengan cara *in vitro* dan *in vivo*. Pengujian secara *in vitro* dapat dilakukan dengan metode spektrofotometer. Pengujian ini menggunakan *pseudo*-substrat, seperti *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosa (p-NPG) (51) dan enzim α -glukosidase. Daya

hambat terhadap aktivitas enzim α -glukosidase dipelajari dengan mengetahui kemampuan sampel untuk menghambat reaksi hidrolisis glukosa pada substrat *p*-NPG (51). Substrat akan terhidrolisis menjadi α -D-glukosa (52) dan *p*-nitrofenol (53) yang berwarna kuning. Warna kuning yang dihasilkan *p*-nitrofenol (53) menjadi indikator kemampuan inhibitor untuk menghambat reaksi yang terjadi (Sugiwati, 2005). Pengujian secara *in vivo* dapat dilakukan dengan menggunakan sel pankreas penghasil enzim α -glukosidase. Pengujian dilakukan dengan memberikan inhibitor pada dosis tertentu pada hewan coba yang menderita diabetes, dan kadar glukosa dalam hewan percobaan tersebut diamati secara berkala. Gambar 2.1 mnujukkan reaksi yang terjadi pada uji aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase.



Gambar 2.1 Reaksi Inhibisi Enzim α -Glukosidase

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain maserator, lampu UV ($\lambda = 256$ dan 366 nm), peralatan kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi kolom gravitasi (KKG), *rotary vacuum evaporator*, neraca analitik, alat ukur titik leleh Fisher John, spektrometer IR Prestige-21 Shimadzu, spektrometer $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Joel JMN ECA 500 MHz, alat-alat gelas, test tube, mikropipet, jarum ose, tip, 96 well plates, oven, *laminar air flow*, inkubator, *vortex mixer*.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah kulit batang mimba (*A. indica*), pelarut organik teknis (seperti *n*-heksana, metilen klorida, kloroform, etil asetat, aseton, metanol). Plat KLT aluminium silika gel 60 GF₂₅₄, silika gel 60 GF₂₅₄, kertas saring, kapas, aluminium foil, enzim α -glukosidase, *p*-nitrophenil- α -D-glukopiranosa (*p*-NPG) (52), buffer fosfat (pH 7,0) 100 mM, larutan Na₂CO₃ 200 mM, HCl 2 N, pereaksi penampak noda serum sulfat (Ce(SO₄)₂) dalam H₂SO₄ 2 N dan akarbosa (48).

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Persiapan Sampel

Sampel kulit batang tumbuhan *A. indica* yang digunakan pada penelitian diperoleh dari Pulau Poteran, Kabupaten Sumenep, Madura. Sampel dipotong menjadi bagian kecil yang kemudian dikeringkan dan dihaluskan sehingga dihasilkan serbuk kering yang siap untuk diekstrak.

3.2.2 Isolasi Senyawa Fenolat dari *A. indica*

Kulit batang *A. indica* yang telah halus dan kering (sebanyak 4 kg) diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol dengan volume 14 L (3x24 jam) sehingga diperoleh ekstrak dan residu. Ekstrak metanol yang diperoleh selanjutnya dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak metanol sebanyak 40 g kemudian difraksinasi I menggunakan KCV dengan eluen *n*-heksana, metilen klorida, etil asetat, etil asetat-metanol (20%), dan metanol secara berurutan. Fraksi yang diperoleh dipantau melalui KLT dengan penampak noda serum sulfat. Pengelompokan fraksi dilakukan pada fraksi-fraksi yang memiliki kemiripan Rf dan pola noda pada KLT sehingga diperoleh tiga fraksi: A, B, dan C. Fraksi B difraksinasi lebih lanjut menggunakan KCV dengan eluen *n*-heksana, *n*-heksana-meten klorida, metilen klorida-etil asetat yang ditingkatkan kepolarnya. Fraksi dengan kemiripan Rf dan pola noda digabung menjadi satu sehingga diperoleh lima fraksi gabungan, yaitu B1-B5. Fraksi B2 difraksinasi lanjut menggunakan KCV dan diperoleh kristal jarum berwarna coklat dalam vial hasil fraksinasi. Kristal kemudian dilakukan rekristalisasi untuk pemurnian, tetapi tidak berhasil. Fraksi B1, B3, dan B4 kemudian digabung dan diperoleh kristal berwarna kuning kecoklatan sebesar 30 mg yang selanjutnya direkristalisasi menggunakan sistem dua pelarut: kloroform-heksena, sehingga diperoleh kristal bening dengan massa 17 mg. Uji kemurnian kristal dilakukan dengan KLT dan diuji titik leleh. Analisa struktur dilakukan dengan pengukuran spektroskopi IR dan NMR.

Fraksinasi II dilakukan pada ekstrak metanol sebanyak 40 g menggunakan KCV dengan 3 kali pengulangan sehingga massa total ekstrak 120 g. Etil asetat digunakan sebagai eluen kolom KCV berdasarkan keefektifan fraksinasi sebelumnya. Hasil fraksinasi II dipantau menggunakan KLT dengan eluen kloroform. Fraksi dengan kemiripan nilai Rf dan pola noda digabung menjadi satu sehingga diperoleh 3 fraksi gabungan, yaitu fraksi D, E, dan fraksi F. Fraksi E mengandung endapan berwarna putih pipih tak beraturan. Endapan direkristalisasi menggunakan sistem dua pelarut; kloroform-metanol, sehingga diperoleh padatan berupa keping pipih tak beraturan berwarna putih, setelah dipisahkan sebanyak 75 mg. Uji kemurnian padatan dilakukan dengan KLT dan uji titik leleh. Analisa struktur dilakukan dengan pengukuran spektroskopi IR dan NMR.

3.3 Uji Aktivitas Inhibisi α -glukosidase

Pengujian aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase dilakukan mengikuti metode Sancheti *et al.* (2009). Campuran reaksi terdiri atas 50 μ L larutan buffer fosfat (pH 7,0) 100 mM, 25 μ L *p*-NPG (**52**) 0,5 mM dalam larutan buffer fosfat (pH 7,0) 100 mM sebagai substrat, 10 μ L larutan sampel (konsentrasi: 500 μ g/mL), dan larutan enzim α -glukosidase 0,04 unit/mL sebanyak 25 μ L. Campuran diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan menambahkan 100 μ L larutan Na₂CO₃ 200 mM. Hasil reaksi selanjutnya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm. Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Tablet akarbosa (**48**) digunakan sebagai kontrol positif. Akarbosa (**48**) dilarutkan dalam buffer dan HCl 2 N (1:1) dengan konsentrasi 1% (b/v) kemudian disentrifugasi. Supernatan diambil sebanyak 10 μ L dan dimasukkan ke dalam campuran reaksi seperti dalam sampel. Pengujian dilakukan di laboratorium Pusat Studi Biofarmaka Institut Pertanian Bogor.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi senyawa-senyawa dari kulit batang *A. indica*

Proses ekstraksi dimulai terlebih dahulu dengan melakukan uji pendahuluan untuk memilih pelarut terbaik yang akan digunakan untuk mengekstrak senyawa. Pengujian bahan menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran berbeda dilakukan untuk melihat profil metabolit sekunder yang terdapat dalam kulit batang *A.indica*, pemantauan dilakukan melalui KLT menggunakan eluen kloroform.



Keterangan:

1. Ekstrak *n*-heksana
2. Ekstrak metilen klorida
3. Ekstrak kloroform
4. Ekstrak etil asetat
5. Ekstrak metanol

Gambar 4.1 Kromatogram Hasil Uji Pendahuluan

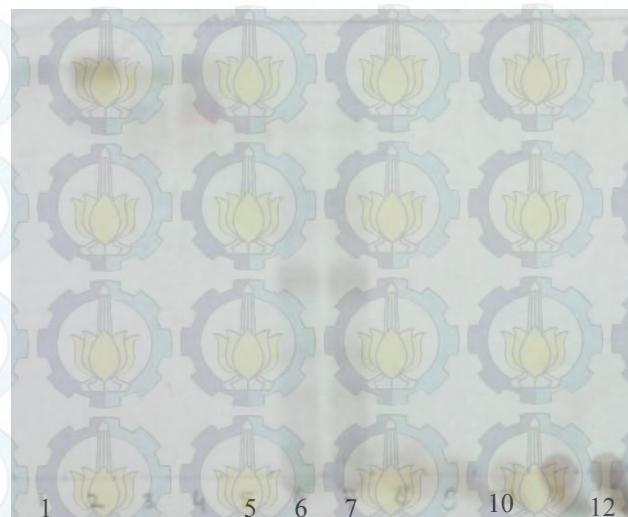
Kromatogram pada Gambar 4.1 menunjukkan bahwa profil metabolit sekunder dari ekstrak *n*-heksana, metilen klorida, kloroform, dan etil asetat tidak berbeda signifikan dan profil senyawa dari ekstrak bahan hanya memberikan noda tipis. Metanol akhirnya dipilih sebagai pelarut, karena metanol sebagai pelarut universal untuk senyawa organik, mampu melarutkan baik senyawa yang bersifat polar atau non polar.

Kulit batang mimba dalam bentuk serbuk kering sebanyak 4 kg diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol dengan volume 14 L (3x24 jam), sehingga diperoleh ekstrak dan residu. Metode maserasi dipilih karena mudah dilakukan, cocok untuk ekstraksi sampel dalam jumlah besar dan tidak terjadi dekomposisi senyawa-senyawa target karena dilakukan di suhu ruang.

Ekstrak metanol yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat sebanyak 409,7 g.

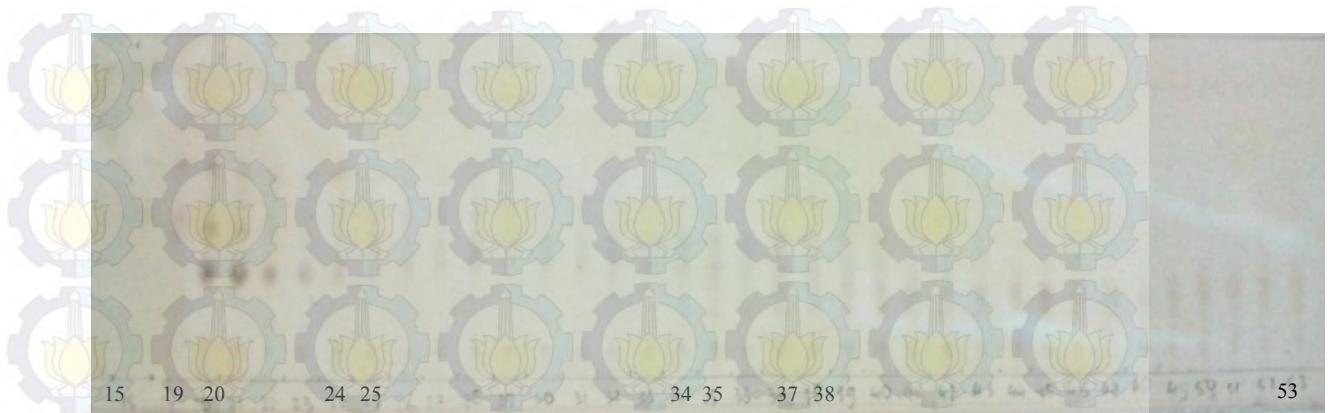
4. 2 Fraksinasi Ekstrak Metanol

Fraksinasi I ekstrak metanol sebanyak 40 g dilakukan menggunakan metode KCV dengan eluen *n*-heksana, metilen klorida, etil asetat, etil asetat-metanol (20%), dan metanol. Hasil fraksinasi I dipantau di atas plat KLT menggunakan eluen kloroform, yang dapat dilihat pada Gambar 4.2. Fraksi dengan nilai R_f dan pola noda relatif sama dikelompokkan menjadi satu fraksi sehingga diperoleh tiga fraksi gabungan, yaitu fraksi A (fraksi 1-5; 0,2 g), fraksi B (fraksi 6-7; 3,7 g), dan fraksi C (fraksi 10-12; 1,8 g).



Gambar 4.2 Kromatogram Hasil Fraksinasi I Ekstrak Metanol

Fraksi B difraksinasi lebih lanjut menggunakan metode KCV dengan eluen *n*-heksana, *n*-heksana-metilen klorida, metilen klorida-etil asetat yang ditingkatkan kepolarnya. Hasil fraksinasi dipantau menggunakan plat KLT dengan eluen kloroform, yang dapat dilihat pada Gambar 4.3. Fraksi dengan kemiripan R_f dan pola noda relatif sama digabung menjadi satu, sehingga diperoleh lima fraksi gabungan, yaitu B1 (fraksi 15-19; 0,1326 g), B2 (fraksi 20-24; 0,4250 g), B3 (fraksi 25-34; 0,2832 g), B4 (fraksi 35-37; 0,0962 g), dan B5 (fraksi 38-53; 0,3985 g) (Gambar 4.4).



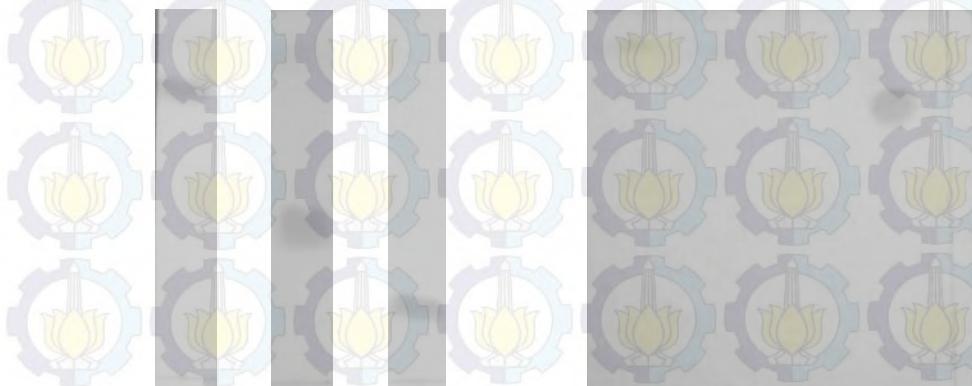
Gambar 4.3 Kromatogram Hasil KCV Fraksi B



Gambar 4.4 Kromatogram Gabungan Fraksi B

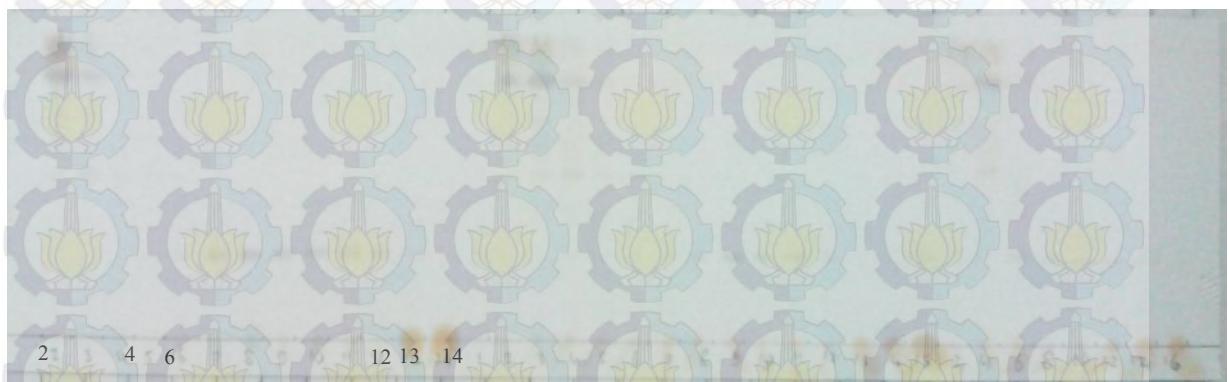
Berdasarkan kromatogram hasil KCV fraksi B, fraksinasi lebih lanjut dilakukan terhadap fraksi B2. Meskipun hasil KCV terhadap fraksi B2 diperoleh kristal, tetapi sulit untuk direkristalisasi sehingga tidak diperoleh senyawa tunggal. Fraksi B1, B3, dan B4 kemudian digabung, dan dilarutkan menggunakan sistem pelarut metilen klorida-heksana (50%). Kristal berwarna kuning kecoklatan sebanyak 30 mg diperoleh dalam vial fraksi gabungan, kristal bersifat larut sempurna dalam pelarut kloroform, tetapi larut tidak sempurna dalam pelarut etanol dan metanol, serta tidak larut dalam *n*-heksana, etil asetat, dan metilen klorida. Kristal yang diperoleh kemudian direkristalisasi menggunakan sistem dua pelarut, yakni kloroform dan *n*-heksana sehingga diperoleh kristal bening sebanyak 17 mg. Hasil rekristalisasi dipantau menggunakan plat KLT untuk menguji kemurniannya (Gambar 4.5). Berdasarkan uji titik leleh diketahui kristal

dari gabungan fraksi B1, B3, dan B4 berupa senyawa (1) memiliki titik leleh 179-180°C.



Gambar 4.5. Hasil Uji Kemurnian Senyawa (1)

Fraksinasi II dilakukan terhadap ekstrak metanol sebanyak 40 g dengan tiga kali pengulangan, sehingga diperoleh fraksi dengan massa yang lebih besar. Pelarut etil asetat digunakan untuk mengelusi kolom KCV berdasarkan keefektifan fraksinasi sebelumnya. Hasil fraksinasi II dipantau menggunakan KLT dengan eluen kloroform yang dapat dilihat pada Gambar 4.6. Fraksi dengan kemiripan nilai R_f dan pola noda relatif sama digabung menjadi satu sehingga diperoleh tiga fraksi gabungan, yaitu fraksi D (fraksi 2-4; 20 g), fraksi E (fraksi 6-12; 1,3 g), dan fraksi F(fraksi 13-14; 7,3 g) (Gambar 4.7).



Gambar 4.6 Kromatogram Fraksinasi II Ekstrak Metanol



Gambar 4.7 Kromatogram Fraksi Gabungan D,E, dan F

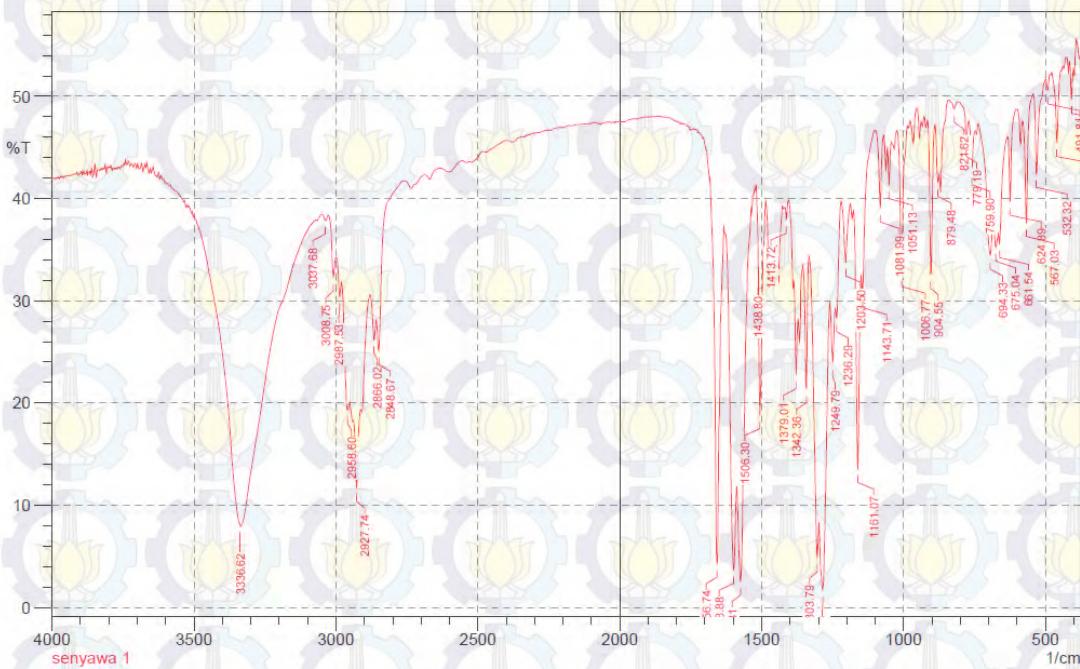
Vial fraksi E terdapat endapan berwarna putih pipih tak beraturan, yang setelah dipisahkan menggunakan kertas saring diperoleh padatan berwarna putih dengan massa 0,3446 g. Uji kelarutan menunjukkan bahwa endapan bersifat tidak larut dalam pelarut *n*-heksana, etil asetat, metilen klorida, metanol, dan etanol. Endapan bersifat larut sebagian pada suhu ruang, dan terlarut sempurna dalam kloroform yang dipanaskan. Endapan kemudian dilarutkan ke dalam kloroform panas, kemudian dipisahkan menggunakan kertas saring untuk menyingkirkan pengotor. Filtrat selanjutnya didiamkan di suhu ruang untuk dilakukan rekristalisasi, tetapi hasilnya negatif. Padatan selanjutnya direkristalisasi menggunakan sistem dua pelarut. Padatan dilarutkan dalam kloroform, kemudian dipanaskan sehingga terlarut sempurna, lalu diuapkan pelarutnya sehingga mendekati titik jenuh dan pelarut metanol. Hasil rekristalisasi terbentuk keping pipih tak beraturan berwarna putih dengan massa 75 mg (senyawa 2). Uji kemurnian selanjutnya dilakukan dengan KLT (Gambar 4.8) dan uji titik leleh dari senyawa (2) menunjukkan nilai 276-277 °C.



Gambar 4.8 Hasil Uji Kemurnian Senyawa (2)

4.2.1 Elusidasi Struktur Senyawa (1)

Spektrum IR senyawa (1) menunjukkan nilai serapan yang khas untuk beberapa gugus fungsi sebagaimana terlihat di Gambar 4.9. Serapan pada bilangan gelombang $1654,74\text{ cm}^{-1}$ adalah serapan khas gugus karbonil, serapan pada $1596,88$ dan $1303,79\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan keberadaan ikatan π terkonjugasi (adanya gugus C=C aromatik), adanya gugus hidroksi ditunjukkan oleh serapan pada $3336,62\text{ cm}^{-1}$, nilai serapan pada $2866,02\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan keberadaan C-H sp^3 stretching, sementara serapan pada $2987,53\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-H sp^2 stretching.



Gambar 4.9 Spektrum IR senyawa (1)

Elusidasi struktur senyawa (**1**) selanjutnya dilakukan menggunakan data spektrum $^1\text{H-NMR}$ (Lampiran B). Pengukuran diakukan menggunakan pelarut kloroform (CDCl_3) pada frekuensi 500 MHz menghasilkan sinyal-sinyal proton pada pergeseran kimia, δ_{H} (ppm): 0,91 (3H, s); 0,96 (3H, s); 1,20 (3H, s); 1,26 (1H, dd, $J_{\text{gem}}= 13,2$ Hz); 1,49 (1H, d); 1,52 (1H, s); 1,66 (1H, m); 1,74 (1H, tt); 1,82 (1H, dd, $J_{\text{gem}}= 13,2$ Hz); 2,18 (1H, s); 2,22 (3H, s); 2,53-2,70 (2H, m); 5,53 (1H, d, $J=7,6$ Hz); 6,72 (1H, s); 7,81 (1H, s). Berdasarkan data ini diketahui minimal terdapat 15 jenis proton.

Analisa terhadap data spektrum $^1\text{H-NMR}$ tersebut, menunjukkan bahwa senyawa (**1**) berdasarkan kajian kemotaksonomi terhadap metabolit sekunder dari tumbuhan *A.indica* diduga merupakan senyawa diterpenoid siklik podokarpian yang dicirikan secara khas oleh tiga proton singlet δ_{H} 0,91; 0,96; dan 1,20 (Ara *et al.*, 1989). Dua proton singlet δ_{H} 6,72 dan 7,81 menunjukkan karakter khas proton dari cincin aromatik tetrasubstitusi. Hal ini bersesuaian dengan analisa spektrum IR yang menunjukkan bahwa senyawa (**1**) memiliki cincin aromatik. Keberadaan gugus hidroksi ditunjukkan proton doublet δ_{H} 5,53. Sinyal singlet δ_{H} 2,22 diduga merupakan proton dari gugus metil sebagai salah satu substituen cincin aromatik.

Elusidasi struktur senyawa (**1**) dilanjutkan dengan menggunakan data dari spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ (Lampiran B). Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ menunjukkan terdapat sedikitnya 18 jenis karbon dengan nilai pergeseran kimia, δ_{C} (ppm): 15,2; 19,0; 21,5; 23,4; 32,7; 33,4; 36,1; 37,8; 38,0; 41,4; 49,6; 109,6; 122,0; 124,5; 130,8; 157,1; 159,0; dan 198,7. Data ini memberikan informasi keberadaan gugus karbonil dengan munculnya sinyal karbon δ_{C} 198,7. Hal ini sesuai dengan informasi dari analisa spektrum IR.

Elusidasi struktur lanjut dilakukan dengan memanfaatkan data dari analisa DEPT dan pengukuran NMR dua dimensi, yaitu HMQC dan HMBC. Analisa DEPT dilakukan untuk mengetahui karakter karbon. Pengukuran NMR dua dimensi HMQC bermanfaat untuk mengkonfirmasi korelasi dari pergeseran kimia karbon dan proton, yang menunjukkan posisi proton tersebut terikat pada karbon. Korelasi HMBC memberikan informasi keterkaitan jarak jauh antara proton dan

karbon tetangga, sehingga dapat memberikan keputusan posisi atom karbon dan hidrogen dengan lebih presisi.

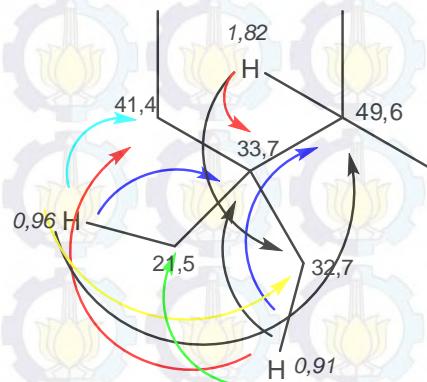
Tabel 4.1. Data Hasil Analisa DEPT dan HMQC Senyawa (1)

δ_C (ppm)	DEPT	δ_H (ppm)
15,2	CH ₃	2,22 (3H, s)
19,0	CH ₂	1,74 (1H,tt); 1,66 (1H, m)
21,5	CH ₃	0,97 (3H, s)
23,4	CH ₃	1,20 (3H, s)
32,7	CH ₃	0,91 (3H, s)
33,4	C _{kuart}	-
36,1	CH ₂	2,53-2,70 (2H, m)
37,8	C _{kuart}	-
38,0	CH ₂	2,18 (1H, s); 1,49 (1H, d)
41,4	CH ₂	1,52 (1H, s); 1,26 (1H, dd, $J_{\text{gem}}=13,2$ Hz)
49,6	CH	1,82 (1H, dd, $J_{\text{gem}}=13,2$ Hz)
109,6	CH	6,72 (1H, s)
122,0	C _{kuart}	-
124,5	C _{kuart}	-
130,8	CH	7,81 (1H, s)
157,1	C _{kuart}	-
159,0	C _{kuart}	-
198,7	C=O	-

Tabel 4.2 Data Korelasi HMBC Senyawa (1)

δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
0,91	41,4; 33,7; 49,6; 21,5
0,96	41,4; 33,7; 49,6; 32,7
1,20	49,6; 157,1; 37,8; 38,0
1,26	-
1,49	37,8
1,52	38,0
1,66	38,0
1,74	-
1,82	33,7; 36,1; 37,8 ; 21,5
2,18	41,4; 49,6
2,22	122,0; 159,0; 130,8
2,53-2,70	49,60; 198,7; 37,8; 38,0
5,53	-
6,72	122,0; 37,8; 159,0; 124,5
7,81	198,7; 157,1; 159,0; 15,2

Data korelasi HMBC di Tabel 4.2 menunjukkan bahwa proton δ_H 0,91 dan 0,96 (masing-masing 3H, s) memiliki tiga korelasi yang sama terhadap karbon tetangga, yaitu karbon δ_C 49,6; 33,7; dan 41,4. Analisa DEPT pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa karbon δ_C 49,6 merupakan karbon tersier; 33,7 karbon kuartener; dan 41,4 karbon sekunder. Proton δ_H 0,91 yang berdasarkan data HMQC terikat pada karbon δ_C 32,7, juga menunjukkan korelasi dengan karbon δ_C 21,5 yang mengikat proton δ_H 0,97, dan sebaliknya, proton δ_H 0,97 diketahui berkorelasi dengan karbon δ_C 32,7. Selain itu, diketahui juga terdapat korelasi dari proton δ_H 1,82 (1H, dd) yang berdasarkan analisa HMQC terikat pada karbon δ_C 49,6, terhadap karbon δ_C 21,5. Memperhatikan pola korelasi antara ketiga sinyal proton dengan karbon tetangganya ini, dapat diprediksikan bahwa keempat karbon δ_C 21,5; 32,7; 41,4; dan 49,6 tersubtitusi pada karbon kuartener δ_C 33,7. Berdasarkan hasil analisa korelasi ini maka fragmen struktur yang disarankan dari korelasi parsial I ditunjukkan oleh Gambar 4.10.

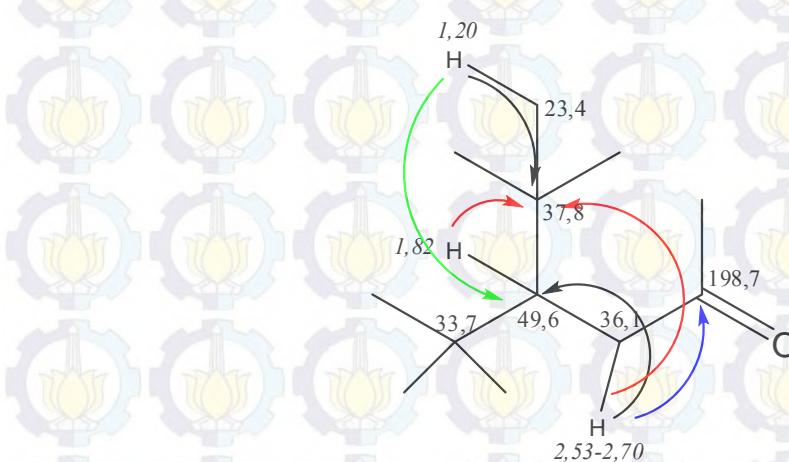


Gambar 4.10 Korelasi HMBC Parsial I dari Senyawa (1).

Proton δ_H 2,53-2,70 (2H, m) berdasarkan data HMQC terikat pada karbon δ_C 36,1. Hal ini sesuai dengan hasil analisa DEPT yang menunjukkan bahwa nilai δ_C 36,1 merupakan sinyal dari karbon sekunder. Proton ini diketahui memiliki korelasi terhadap karbon δ_C 49,6; 198,7; 37,8; dan 38,0. Karbon δ_C 198,7 diketahui merupakan karbon karbonil, sedangkan sinyal pada δ_C 37,8 menurut analisa DEPT merupakan karbon kuartener. Fakta ini diperkuat oleh data HMQC

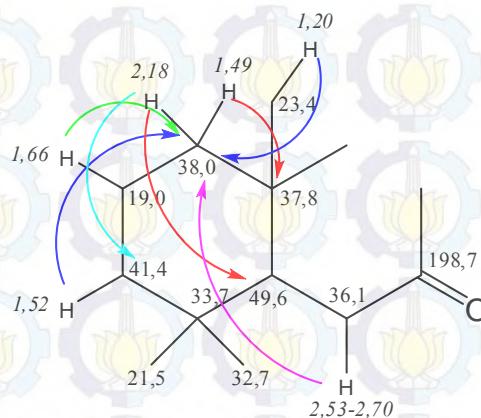
yang menunjukkan bahwa pada sinyal ini tidak memiliki korelasi dengan proton manapun. Selain itu juga terjadi korelasi terhadap karbon δ_C 37,8 dari proton δ_H 1,82 yang terikat pada karbon δ_C 49,6 dan proton δ_H 1,20 (3H, s) yang berdasarkan analisa HMQC terikat pada karbon δ_C 23,4. Analisa DEPT juga menunjukkan bahwa δ_C pada 23,4 merupakan sinyal dari karbon metil. Proton δ_H 1,20 (3H, s) diketahui juga memiliki korelasi terhadap karbon δ_C 38,0; 49,6; dan 157,1. Pola korelasi ini menunjukkan indikasi bahwa karbon sekunder δ_C 36,1 tersubstitusi pada karbon tersier δ_C 49,6 dan karbon karbonil. Prediksi ini diperkuat laporan dari Majumder *et al.* (1987) bahwa δ_H pada 2,53-2,70 ppm mengindikasikan sinyal proton gugus metilen keton ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{C}-$) dari senyawa diterpen trisiklik podokarpan.

Karbon tersier δ_C 49,6 Berdasarkan analisa sejauh ini diindikasikan telah tersubstitusi oleh karbon kuarter δ_C 33,7 dan karbon sekunder δ_C 36,1. Memperhatikan pola korelasi yang terjadi pada karbon δ_C 37,8, maka dapat diprediksi bahwa karbon ini juga tersubstitusi pada karbon tersier δ_C 49,6. Karbon metil δ_C 23,4 diduga tersubstitusi pada karbon δ_C 37,8. Sehingga fragmen struktur yang disarankan dari analisa korelasi parsial II dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11 Korelasi HMBC Parsial II dari Senyawa (1).

Proton δ_H 1,20 yang terikat pada karbon δ_C 23,4 sebagaimana disebutkan di paragraf sebelumnya, juga memiliki korelasi dengan karbon δ_C 38,0. Data DEPT menunjukkan bahwa δ_C 38,0 merupakan sinyal dari karbon sekunder. Berdasarkan analisa HMQC karbon ini mengikat proton δ_H 2,18 (1H, s) dan 1,49 (1H, d). Proton δ_H 1,49 menurut data HMBC memiliki korelasi dengan karbon tetangga δ_C 37,8, sedangkan proton δ_H 2,18 memiliki korelasi terhadap karbon δ_C 41,4 dan 49,6. Karbon sekunder δ_C 38,0 diketahui terkorelasi juga dengan proton δ_H 1,52 dan 1,66. Berdasarkan data HMQC proton δ_H 1,52 terikat pada karbon δ_C 41,4, sedangkan proton δ_H 1,66 terikat pada karbon δ_C 19,0. Menurut data DEPT δ_C 19,0 merupakan sinyal dari karbon sekunder. Memperhatikan pola korelasi ini, dapat diprediksikan bahwa karbon δ_C 38,0 tersubstitusi pada karbon kuarter δ_C 37,8 dan 19,0. Hal ini diperkuat dengan adanya korelasi dari proton δ_H 2,53-2,70 dari karbon δ_C 36,1, korelasi ini tidak memungkinkan karbon δ_C 38,0 tersubstitusi pada karbon δ_C 41,4. Berdasarkan analisa ini, maka fragmen struktur yang disarankan dari pola korelasi HMBC parsial III dari senyawa (1) dapat dilihat di Gambar 4.12



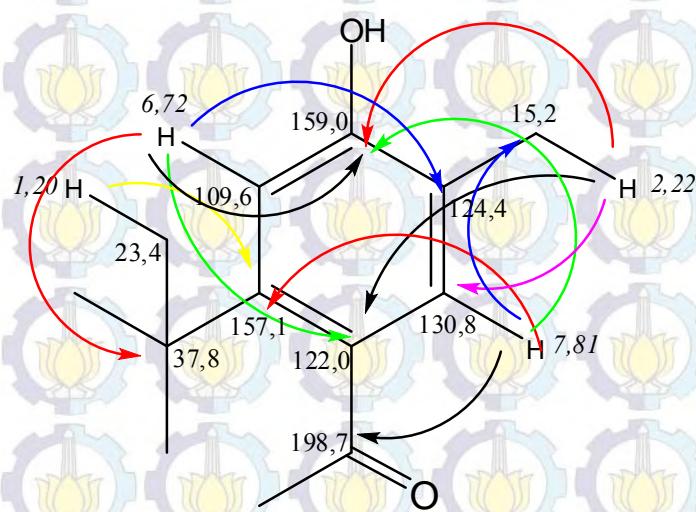
Gambar 4.12 Korelasi HMBC Parsial III dari Senyawa (1).

Keberadaan cincin aromatik dalam senyawa (1) telah diketahui dari informasi spektrum IR dan data 1H -NMR dengan munculnya dua sinyal proton aromatik δ_H 7,81 dan 6,72. Proton aromatik δ_H 7,81 (1H, s) berdasarkan analisa HMQC terikat oleh karbon δ_C 130,8, bersesuaian dengan data DEPT bahwa karbon ini merupakan karbon tersier. Proton ini menurut data HMBC diketahui

memiliki korelasi dengan karbon δ_C 198,7; 15,2; 157,1 dan 159,0. Karbon δ_C 198,7 telah diketahui sebagai karbon karbonil. Sinyal δ_C 15,2 menurut data DEPT menunjukkan karbon metil. Menurut analisa HMQC karbon ini mengikat proton δ_H 2,22 (3H, s). Karbon δ_C 157,1 dan 159,0 berdasarkan data DEPT merupakan karbon kuarter, fakta ini diperkuat oleh analisa HMQC bahwa kedua karbon ini tidak memiliki korelasi dengan sinyal proton. Proton aromatik δ_H 6,72 (1H, s) menurut data HMQC terikat pada karbon δ_C 109,6, konsisten dengan hasil analisa DEPT yang menunjukkan bahwa karbon ini merupakan karbon tersier. Berdasarkan data HMBC proton ini memiliki korelasi dengan karbon δ_C 37,8; 122,0; 124,5 dan 159,0. Karbon δ_C 122,0 dan 124,5 menurut data DEPT merupakan karbon kuarter, hal ini diperkuat dengan analisa HMQC bahwa kedua karbon ini tidak memiliki korelasi dengan proton manapun. Proton δ_H 2,22 (3H, s) yang diketahui terikat oleh karbon δ_C 15,2 memiliki korelasi terhadap karbon δ_C 122,0; 130,8 dan 159,0. Selain itu, diketahui korelasi dari proton δ_H 1,20 yang terikat di karbon δ_C 23,4 terhadap karbon δ_C 157,0 juga.

Memperhatikan pola korelasi yang terjadi, karbon δ_C 157,0 dapat diprediksikan tersubtitusi pada karbon kuarter δ_C 37,8 berdasarkan adanya korelasi dari proton δ_H 1,20 terhadap karbon δ_C 157,0. Karena proton aromatik δ_H 6,72 diketahui memiliki korelasi terhadap karbon kuarter δ_C 37,8, maka karbon δ_C 109,6 diduga tersubtitusi pada karbon δ_C 157,0. Karbon karbonil δ_C 198,7 diketahui tersubtitusi dengan karbon sekunder δ_C 36,1. Adanya korelasi dari proton aromatik δ_H 7,81 yang terikat pada karbon δ_C 130,8 menunjukkan karbon karbonil tersubtitusi pada karbon di cincin aromatik, dan bertetangga dengan karbon δ_C 130,8, tetapi belum diketahui karbon yang mana yang mensubtitusinya. Memperhatikan pola korelasi dari proton δ_H 2,22 yang diketahui terikat dengan karbon δ_C 15,2 terhadap karbon δ_C 122,0; 130,8 dan 159,0, dapat diprediksikan bahwa karbon metil δ_C 15,2 tersubtitusi pada δ_C 124,4. Proton aromatik δ_H 7,81 diketahui juga memiliki korelasi terhadap karbon δ_C 15,2 sehingga dapat diprediksikan bahwa karbon δ_C 130,8 tersubtitusi pada karbon δ_C 124,4 dan karbon yang mensubtitusi karbon karbonil δ_C 198,7. Sejauh ini telah terpetakan

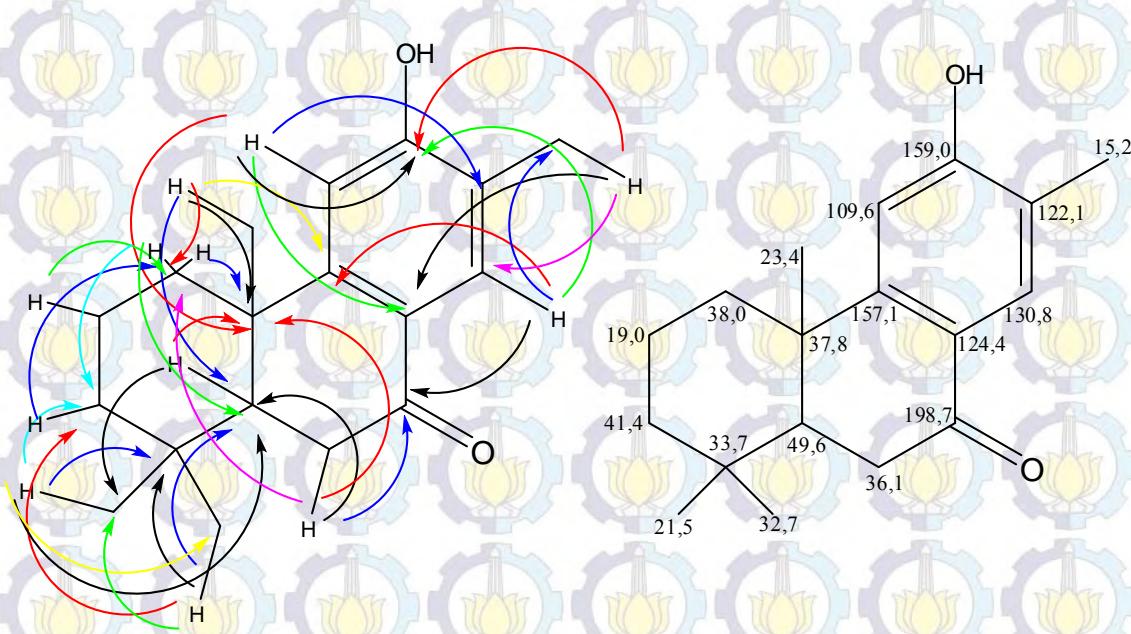
posisi karbon δ_C 157,0; 109,6; 130,8; dan 124,4. Tersisa dua atom karbon, δ_C 122,0 dan 159,0. Berdasarkan hal ini, dapat diprediksikan bahwa karbon karbonil tersubtitusi pada karbon δ_C 122,0. Memperhatikan besarnya nilai pergeseran kimia pada karbon δ_C 159,0, maka diprediksikan karbon ini mengikat gugus hidroksi. Dugaan ini diperkuat oleh adanya korelasi dari proton aromatik δ_H 6,72, sehingga dapat diprediksi bahwa karbon δ_C 159,0 tersubtitusi dengan karbon δ_C 109,6. Hal ini diperkuat dengan adanya korelasi proton δ_H 2,22 dari karbon metil δ_C 15,2 terhadap karbon δ_C 122,0. Korelasi ini tidak memungkinkan gugus metil terikat pada atom karbon yang tersubtitusi dengan karbon δ_C 109,6. Berdasarkan analisa ini, maka fragmen struktur yang disarankan dari pola korelasi HMBC parsial IV yang terdapat pada cincin aromatik ditunjukkan pada Gambar 4.13.



Gambar 4.13 Korelasi HMBC Parsial IV dari Senyawa (1).

Penggabungan keempat pola korelasi parsial dari senyawa (1) akan membentuk pola korelasi gabungan dan struktur utama yang disarankan seperti di Gambar 4.14. Rumus molekul dari senyawa ini adalah $C_{18}H_{24}O_2$. Nilai DBE (*Double Bond Equivalent*) = $18 - 12 + 1 = 7$, sesuai dengan struktur utama yang disarankan untuk senyawa (1). Senyawa ini diketahui telah dilaporkan berhasil diisolasi dari *A.indica* oleh Sengupta *et al.* (1957) dan Ara *et al.* (1989), dikenal dengan nama senyawa nimbiol. Terisolasi senyawa nimbiol dalam penelitian ini membuktikan bahwa tumbuhan *A.indica* yang dibudidayakan di Pulau Poteran, memiliki senyawa metabolit sekunder khas yang memiliki kesamaan dengan

tumbuhan *A.indica* yang berasal dari Pakistan sebagaimana dilaporkan Ara *et al.* (1989).



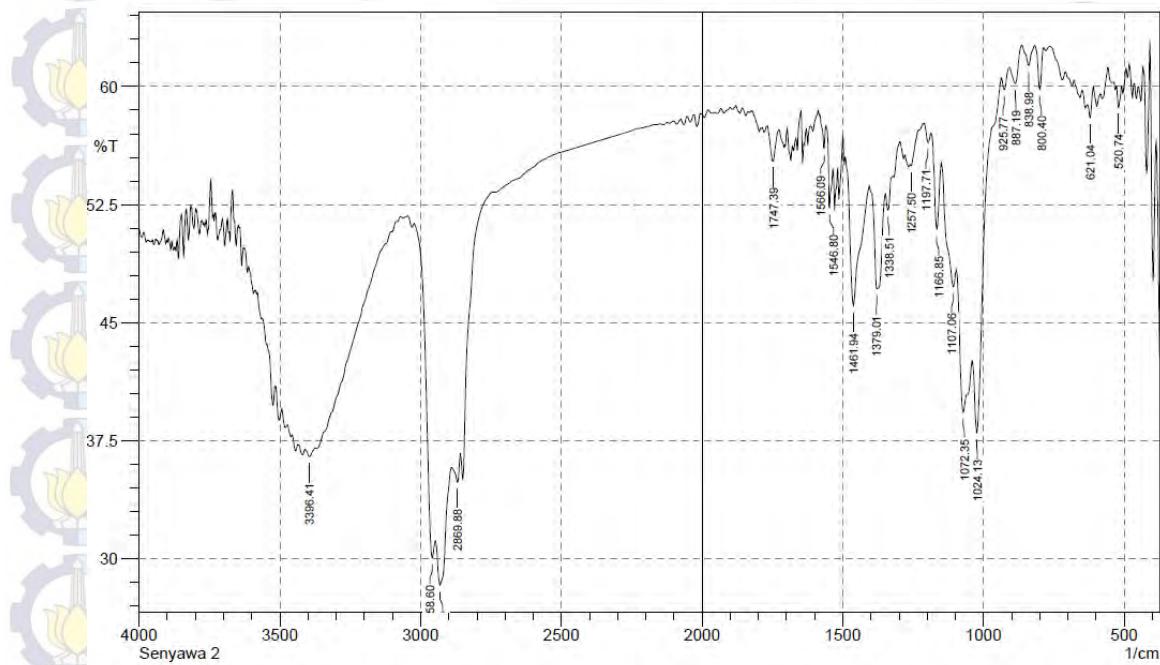
Gambar 4.14 Pola Korelasi HMBC Gabungan dan Struktur yang disarankan untuk Senyawa (1)

4.2.2 Elusidasi Struktur Senyawa (2)

Spektrum IR senyawa (2) menunjukkan nilai serapan yang terbatas untuk beberapa gugus fungsi sebagaimana terlihat di Gambar 4.15. Serapan pada bilangan gelombang $3396,41\text{ cm}^{-1}$ adalah serapan khas gugus hidroksi, serapan pada $1072,06$ dan $1024,13\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan keberadaan gugus C-O, sedangkan nilai serapan pada $2931,60\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan keberadaan C-H sp^3 stretching.

Elusidasi struktur selanjutnya dilakukan dengan melakukan analisa terhadap data pergeseran kimia dari spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$. Pengukuran dilakukan pada frekuensi 500 MHz (^1H) dan 125 MHz (^{13}C) menggunakan pelarut CDCl_3 (ditambah sedikit CD_3OD). Berdasarkan pola sinyal, diperoleh informasi bahwa senyawa (2) diduga merupakan senyawa β - sitosterol- $3-O$ -glikosida, senyawa ini adalah senyawa yang lazim ditemukan di setiap tumbuhan. Data spektra $^{13}\text{C-NMR}$ dari senyawa (2) adalah sebagai berikut, δ_{C} (ppm): 38,8; 28,3; 77,0; 39,8; 140,3; 122,3; 31,9; 32,5; 50,2; 37,3; 21,1; 39,7; 42,4; 56,8; 24,4; 28,3; 56,1; 11,9; 19,1; 36,8; 18,8; 34,0; 26,1; 45,9; 29,2, 19,4;

19,9; 23,1, 12,0; 101,1; 75,6; 76,3; 73,6; 79,3; 62,0 secara berurutan dari kerangka terpenoid ke glikosida.



Gambar 4.15 Spektrum IR Senyawa (2)

Tabel 4.4 Perbandingan Data Pergeseran Kimia $^1\text{H-NMR}$ dari senyawa (2) dengan β - sitosterol-3-O-glikosida

Posisi Karbon	δ_{H} (ppm)	
	senyawa (2)	β - sitosterol-3-O-glikosida*
3	3,41-3,43 (1H, m)	3,43 (1H, m)
6	5,32 (1H, br s)	5,40 (1H, br d)
18	0,63 (3H, d)	0,69 (3H, s)
19	0,96 (3H, d)	1,05 (3H, s)
21	0,96 (3H, d)	0,95 (3H, d)
26	0,76 (3H, m)	0,82 (3H, d)
27	0,79 (3H, m)	0,84 (3H, d)
29	0,87 (3H, m)	0,85 (3H, d)
1'	4,35 (1H, d)	4,40 (1H, d)
2'	3,50-3,52 (1H, m)	3,55-3,62 (1H, m)
3'	3,52-3,55 (1H, m)	3,45-3,62 (1H, m)
4'	3,38-3,41 (1H, m)	3,36-3,40 (1H, m)
5'	3,79-3,81 (1H, m)	3,75-3,88 (1H, m)
6'	3,24-3,27 (1H, m)	3,28 (1H, m)

Keterangan: *Ruangnoo (2007)

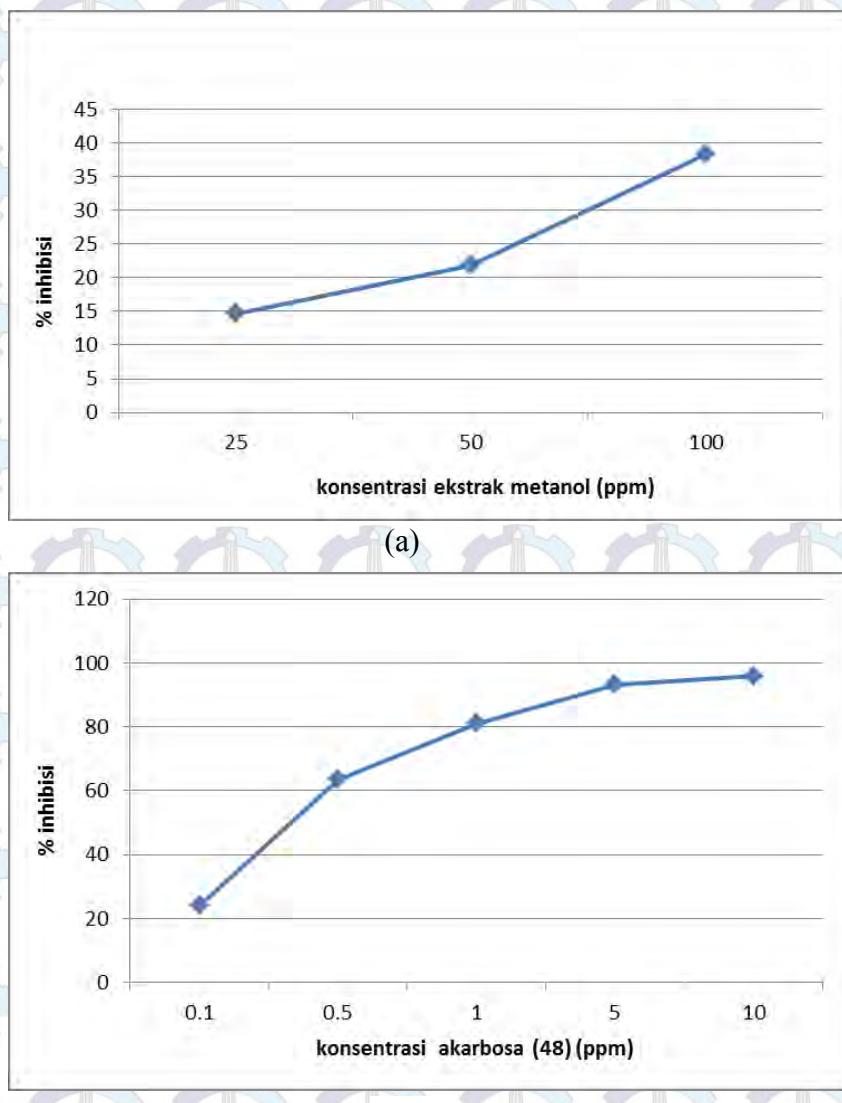
Tabel 4.45 menunjukkan perbandingan data nilai pergeseran kimia hasil pengukuran $^1\text{H-NMR}$ dari senyawa (2) dan senyawa β - sitosterol-3-*O*-glikosida. Berdasarkan analisa data spektra $^{13}\text{C-NMR}$ dan $^1\text{H-NMR}$ ini, maka struktur utama yang disarankan dari senyawa 2 adalah senyawa β - sitosterol-3-*O*-glikosida.

4.3 Uji Aktivitas Inhibisi α -glukosidase

4.3.1 Uji Aktivitas Ekstrak Metanol

Uji aktivitas inhibisi ekstrak metanol kulit batang *A. indica* terhadap enzim α -glukosidase dilakukan pada kisaran konsentrasi 25, 50 dan 100 ppm. Larutan akarbosa (48) digunakan sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 0,1; 0,5; 1, 5 ppm, dan 10 ppm. DMSO digunakan sebagai kontrol negatif sekaligus pelarut.

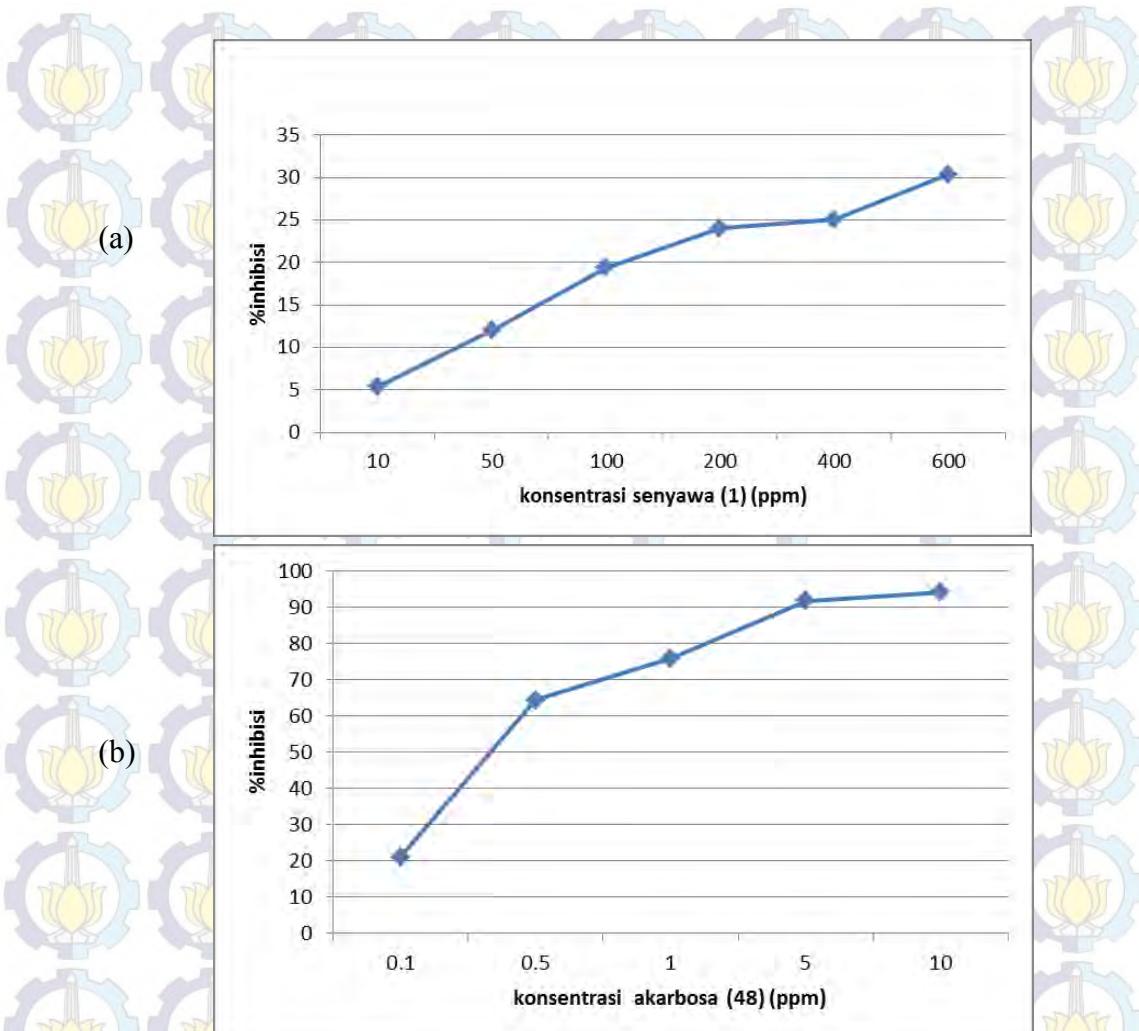
Gambar 4.16.a menunjukkan kurva nilai % inhibisi dari ekstrak metanol terhadap enzim α -glukosidase. Grafik menunjukkan bahwa dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak, nilai % inhibisi meningkat. Kinerja inhibisi dari standar akarbosa terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 4.16.b, akarbosa (48) pada konsentrasi 10 ppm memiliki aktivitas inhibisi 95,84 %. Data menunjukkan bahwa ekstrak metanol yang diinvestigasi pada penelitian belum menunjukkan potensi inhibisi yang signifikan terhadap enzim α -glukosidase. Dibandingkan terhadap standar akarbosa (48), pada konsentrasi 5 ppm ekstrak metanol memiliki aktivitas inhibisi sebesar 5,64 %, sedangkan standar akarbosa (48) sebesar 92,91% dengan nilai IC_{50} 0,29 ppm. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari kulit batang pada konsentrasi di bawah 100 ppm bersifat kurang aktif.



Gambar 4.16 Aktivitas Inhibisi Ekstrak Metanol (a) dan Akarbosa (48) (b)

4.3.1 Uji Aktivitas Senyawa (1) dan (2)

Uji aktivitas inhibisi terhadap enzim α -glukosidase senyawa hasil isolasi dilakukan dalam kisaran konsentrasi 10, 50, 100, 200, 400 dan 600 ppm. Larutan akarbosa (48) digunakan sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 0,1; 0,5; 1; 5 dan 10 ppm. DMSO digunakan sebagai pelarut dan kontrol negatif.



Gambar 4.17 Aktivitas Inhibisi Senyawa (1) (a) dan Akarbosa (48) (b)

Gambar 4.17 menunjukkan grafik hubungan aktivitas inhibisi senyawa hasil isolasi dan akarbosa (48). Aktivitas inhibisi senyawa (1) meningkat dengan bertambahnya konsentrasi, tetapi lebih rendah dari pada aktivitas ekstrak metanol dan akarbosa (48). Nilai IC₅₀ dari standar akarbosa (48) adalah 0,34 ppm. Hasil pengujian menunjukkan bahwa pada konsentrasi di bawah 600 ppm senyawa (1) bersifat kurang aktif, sedangkan senyawa (2) bersifat tidak aktif karena tidak memberikan respon terhadap aktivitas enzim pada konsentrasi kurang dari 600 ppm. Data menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan senyawa (1) memiliki aktivitas yang inhibisi yang sangat lemah terhadap enzim α -glukosidase daripada standar akarbosa (48).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Ekstrak metanol kulit batang tumbuhan Mimba (*A.indica*) asal Pulau Poteran-Madura mengandung senyawa fenolat diterpenoid berupa nimbiol (1) dan turunan terpenoid senyawa glikosida β -sitosterol-3-*O*-glikosida (2), kedua senyawa ini telah dilaporkan oleh Ara I (1989). Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan senyawa (1) memiliki aktivitas inhibisi terhadap enzim α -glukosidase yang lemah dibandingkan standar akarbosa (48), sedangkan senyawa (2) bersifat tidak aktif.

5.2 Saran

Penelitian lanjut di bagian tumbuhan *A. indica* yang lainnya untuk meningkatkan peluang ditemukannya senyawa dengan aktivitas inhibisi terhadap enzim α -glukosidase yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah, H.M., Salama, M.M., Abd-elrahman E.H., El-Maraghy, S.A., 2011. Antidiabetic activity of phenolic compounds from Pecan bark in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytochem. Lett.* 4, 337–341.
- Ajaiyeoba, E.O., Oladepo, O., Fawole, O.I., Bolaji, O.M., Akinboye, D.O., Ogundahunsi, O.A.T., Falade, C.O., Gbotosho, G.O., Itiola, O.A., Happi, T.C., Ebong, O.O., Ononiwu, I.M., Osowole, O.S., Oduola, O.O., Ashidi, J.S., Oduola, A.M.J., 2003. Cultural categorization of febrile illnesses in correlation with herbal remedies used for treatment in Southwestern Nigeria. *J. Ethnopharmacol.* 85, 179–185.
- American Diabetes Association, 2005. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 28, 537–542.
- Ara I. 1989. Studies in the chemical constituents of *Azadirachta indica* (Neem). Disertasi. Dept of Chem. Karachi Univ. Pakistan
- Ara, I., Siddiqui, B.S., Faizi, S., Siddiqui, S., 1988. Terpenoids from the bark of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry* 27, 1801–1804.
- Ara, I., Siddiqui, B.S., Faizi, S., Siddiqui, S., 1989. Diterpenoids from the stem bark of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry* 28, 1177–1180.
- Balasubramanian, C., Mohan, P.S., Arumugasamy, K., Udayan, K., 1993. Flavanoid from resin glands of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry* 34, 1194–1195.
- Bhattacharya, S. 2013. Health promoting effects of bioactive compounds in plants: Targeting Type 2 diabetes. Disertasi. Dept Food Sci. Aarhus Univ. Denmark
- Benoit, F., Valentin, A., Pelissier, Y., Diafouka, F., Marion, C., Kone-Bamba, D., Kone, M., Mallie, M., Yapo, A., Bastide, J.M., 1996. *In vitro* antimarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 67–71.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R.K., Bandyopadhyay, U., 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Curr. Sci.* 82, 1336–1345.
- Bukar, A., Danfillo, I.S., Adeleke, O.A., Ogunbodede, E.O., 2004. Traditional oral health practices among Kanuri women of Borno State, Nigeria. *Odonto-Stomatol. Trop. Dent. J.* 27, 25–31.

- Charles, V., Charles, S.X., 1992. The use and efficacy of *Azadirachta indica* ADR ('Neem') and *Curcuma longa* ('Turmeric') in scabies. A pilot study. *Trop. Geogr. Med.* 44, 178–181.
- Chattopadhyay, R.R., 1999. Possible mechanism of antihyperglycemic effect of *Azadirachta indica* leaf extract: Part V. *J. Ethnopharmacol.* 67, 373–376.
- Departemen Kesehatan dan Sosial RI.2005. Pedoman Pelaksanaan Promosi Kesehatan di Daerah, Jakarta.
- Fabry, W., Okemo, P., Ansorg, R., 1996. Fungistatic and fungicidal activity of east African medicinal plants. *Mycoses* 39, 67–70.
- Gao, H., Huang, Y.-N., Xu, P.-Y., Kawabata, J., 2007. Inhibitory effect on α -glucosidase by the fruits of *Terminalia chebula* Retz. *Food Chem.* 105, 628–634.
- Garg, H.S., Bhakuni, D.S., 1984. An isoprenylated flavanone from leaves of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*, 2115–2118.
- Hsieh P.-C., Huang G.-J., Ho Y.-L., Lin Y.-H., Huang S.-S., Chiang Y.-C., Tseng M.-C., Chang Y.-S., 2010. Activities of antioxidants, α -glukosidase inhibitors and aldose reductase inhibitors of the aqueous extracts of four *Flemingia* species in Taiwan. *Botanical Studies* 51, 293-302.
- Jabbar, A., Raza, M.A., Iqbal, Z., Khan, M.N., 2006. An inventory of the ethnobotanicals used as anthelmintics in the southern Punjab (Pakistan). *J. Ethnopharmacol.* 108, 152–154.
- Jain, A., Basal, E., 2003. Inhibition of *Propionibacterium acnes*-induced mediators of inflammation by Indian herbs. *Phytomedicine* 10, 34–38.
- Khillare, B., Shrivastav, T.G., 2003. Spermicidal activity of *Azadirachta indica* (neem) leaf extract. *Contraception* 68, 225–229.
- Khosla, P., Bhanwra, S., Singh, J., Seth, S., Srivastava, R.K., 2000. A study of hypoglycaemic effects of *Azadirachta indica* (Neem) in normal and alloxan diabetic rabbits. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 44, 69–74.
- Labadie, R.P., van der Nat, J.M., Simons, J.M., Kroes, B.H., Kosasi, S., van den Berg, A.J., t'Hart, L.A., van der Sluis, W.G., Abeysekera, A., Bamunuarachchi, A., 1989. An ethnopharmacognostic approach to the search for immunomodulators of plant origin. *Planta Med.* 55, 339–348.
- Majumder, P.L., Maiti, D.C., Kraus, W., Bokel, M., 1987. Nimbidiol, a modified diterpenoid of the root-bark of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry* 26, 3021–3023

- Mandal, S., Barik, B., Mallick, C., De, D., Ghosh, D., 2008. Therapeutic effect of ferulic acid, an ethereal fraction of ethanolic extract of seed of *Syzygium cumini* against streptozotocin-induced diabetes in male rat. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 30, 121–128.
- Manickam, M., Ramanathan, M., Jahromi, M.A., Chansouria, J.P., Ray, A.B., 1997. Antihyperglycemic activity of phenolics from *Pterocarpus marsupium*. *J. Nat. Prod.* 60, 609–610.
- Mishra, R.K., Singh, S.K., 2005. Effect of aqueous leaf extract of *Azadirachta indica* on the reproductive organs in male mice. *Indian J. Exp. Biol.* 43, 1093–1103.
- Murray, R.K., Daryl K.G., Victor, W.R., 2009. *Biokimia Harper Edisi* 27. Terjemahan. Nanda Wulandari, Jakarta: EGC.
- Nakahara, K., Roy, M.K., Ono, H., Maeda, I., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., Trakoontivakorn, G., 2003. Prenylated flavanones isolated from flowers of *Azadirachta indica* (the neem tree) as antimutagenic constituents against heterocyclic amines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6456–6460.
- National Research Council, 1992. Neem: a tree for solving global problem, report of an ad-hoc panel of the Board on Science and Technology for International Development. National Academy Press, Washington, DC.
- Omar, S., Zhang, J., MacKinnon, S., Leaman, D., Durst, T., Philogene, B.J.R., Arnason, J.T., Sanchez-Vindas, P.E., Poveda, L., Tamez, P.A., Pezzuto, J.M., 2003. Traditionally-used antimalarials from the *Meliaceae*. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 133–139.
- Pari, L., Satheesh, M.A., 2006. Effect of pterostilbene on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin- and nicotinamide-induced diabetic rats. *Life Sci.* 79, 641–645.
- Pei-Wu, G., Fukuyama, Y., Rei, W., Jinxian, B., Nakagawa, K. 1988. An acylated sitosterol glucoside from *Alisma plantago-aquatica*. *Phytochemistry*, 27:1895-1898
- Priosoeryanto B P, Madyastuti R, Wientarsih I, Prasetyo B F.2009. efek Antihiperglikemik Ekstrak etanol daun Mimba (*Azadirachta indica* J) pada Tikus Diabetes yang diinduksi Aloksan dan pengembangannya menjadi sediaan Tablet menggunakan Metode Granulasi Basah. Prosiding Seminar Hasil Penelitian IPB
- Ruangnoo, S. 2007. Antioxidant and cytotoxic activities of triphala formula. Tesis.Faculty of Pharm Sci.Prince of Songkla University.Thailand

- Sancheti S., Sancheti S., Seo SY., 2009. *Chaenomeles sinensis*: a potent α -and β -glucosidase inhibitor. *American J. of Pharmacol. and Toxicology*. 4, 8-11.
- Sari, Y. P., 2013. Isolation and characterization of antioxidant compounds from *Azadirachta indica* leaves. Tesis. Teknik Kimia. ITS. Surabaya
- Sheehan, E.W., Zemaitis, M.A., Slatkin, D.J., Schiff, P.L., Jr, 1983. A constituent of *Pterocarpus marsupium*, (-)-epicatechin, as a potential antidiabetic agent. *J. Nat. Prod.* 46, 232–234.
- Shori, A.B., Baba, A.S., 2011. Antioxidant activity and inhibition of key enzymes linked to type-2 diabetes and hypertension by *Azadirachta indica*-yogurt. *J. Saudi Chem. Society* 17, 295–301.
- Siddiqui, S., Siddiqui, B.S., Faizi, S., Mahmood, T., 1984. Isolation of a tetranortriterpenoid from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry* 23, 2899–2901
- Siddiqui, S., Ara, I., Faizi, S., Mahmood, T., 1988. Phenolic tricyclic diterpenoids from the bark of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry* 27, 3903–3907.
- Soegihardjo, C.J. 2007. Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss, suku Meliaceae), Tumbuhan Multi Manfaat yang Dapat Menanggulangi Persoalan Rakyat Indonesia. *Sigma*, Vol. 10, No.1: 83-102
- Soegondo S., 2009. Diagnosis dan Klasifikasi Diabetes Mellitus Terkini. Dalam Soegondo S dkk (edisi ke-2), Penatalaksanaan Diabetes Mellitus Terpadu. Penerbit FKUI. Jakarta.
- Sugiwati S., 2005. Aktivitas antihiperglikemik dari ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.) sebagai inhibitor α -glukosidase *in vitro* dan *in vivo* pada tikus putih. Tesis. Bogor: Program Pascasarjana, Institut pertanian Bogor.
- Tan, C., Wang, Q., Luo, C., Chen, S., Li, Q., Li, P., 2013. Yeast α -glucosidase inhibitory phenolic compounds isolated from *Gynura medica* leaf. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 2551–2558.
- Wandscheer, C.B., Duque, J.E., da Silva, M.A.N., Fukuyama, Y., Wohlke, J.L., Adelmann, J., Fontana, J.D., 2004. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 44, 829–835.
- WHO, 2006. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. WHO Publications.

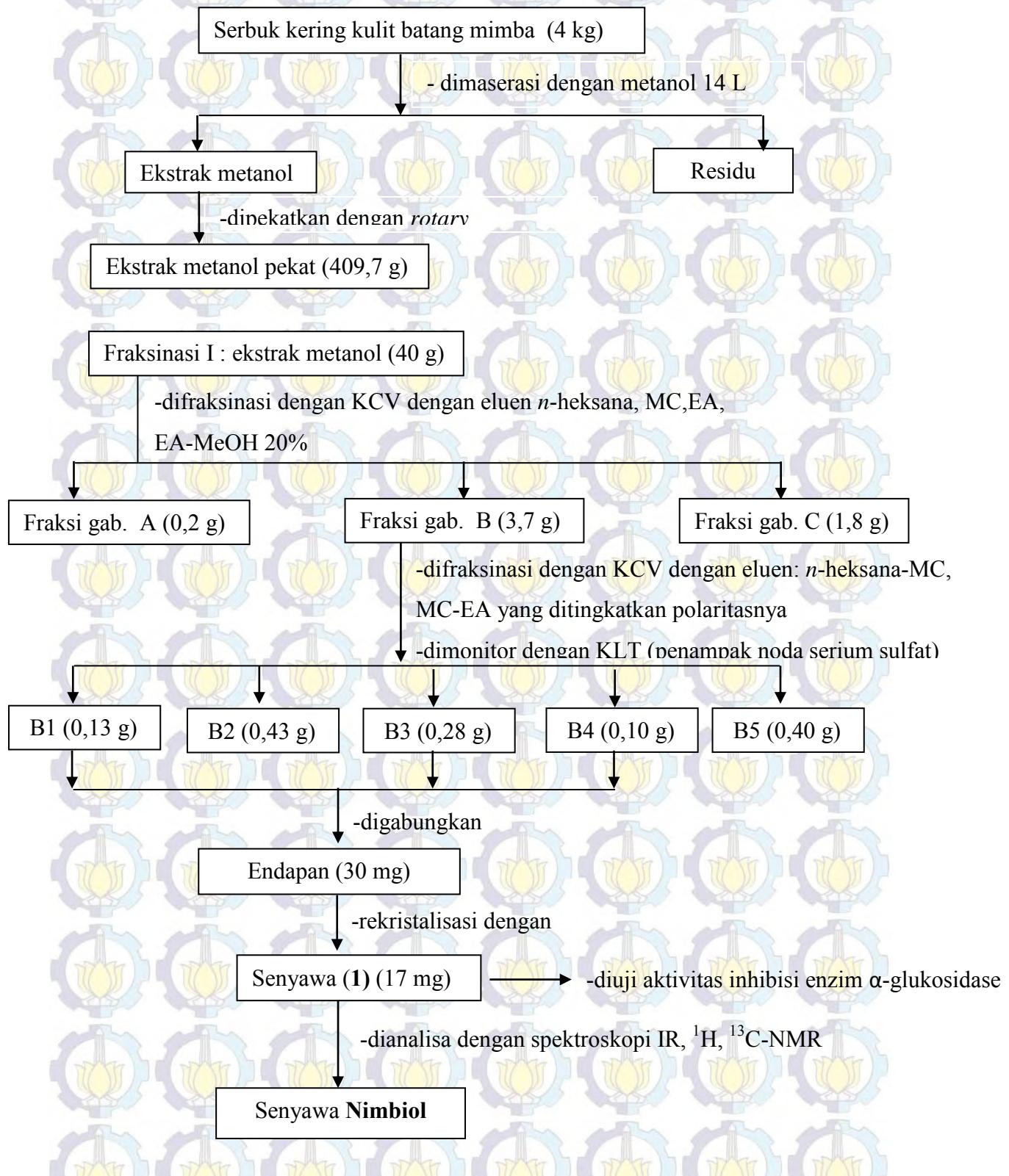
LAMPIRAN

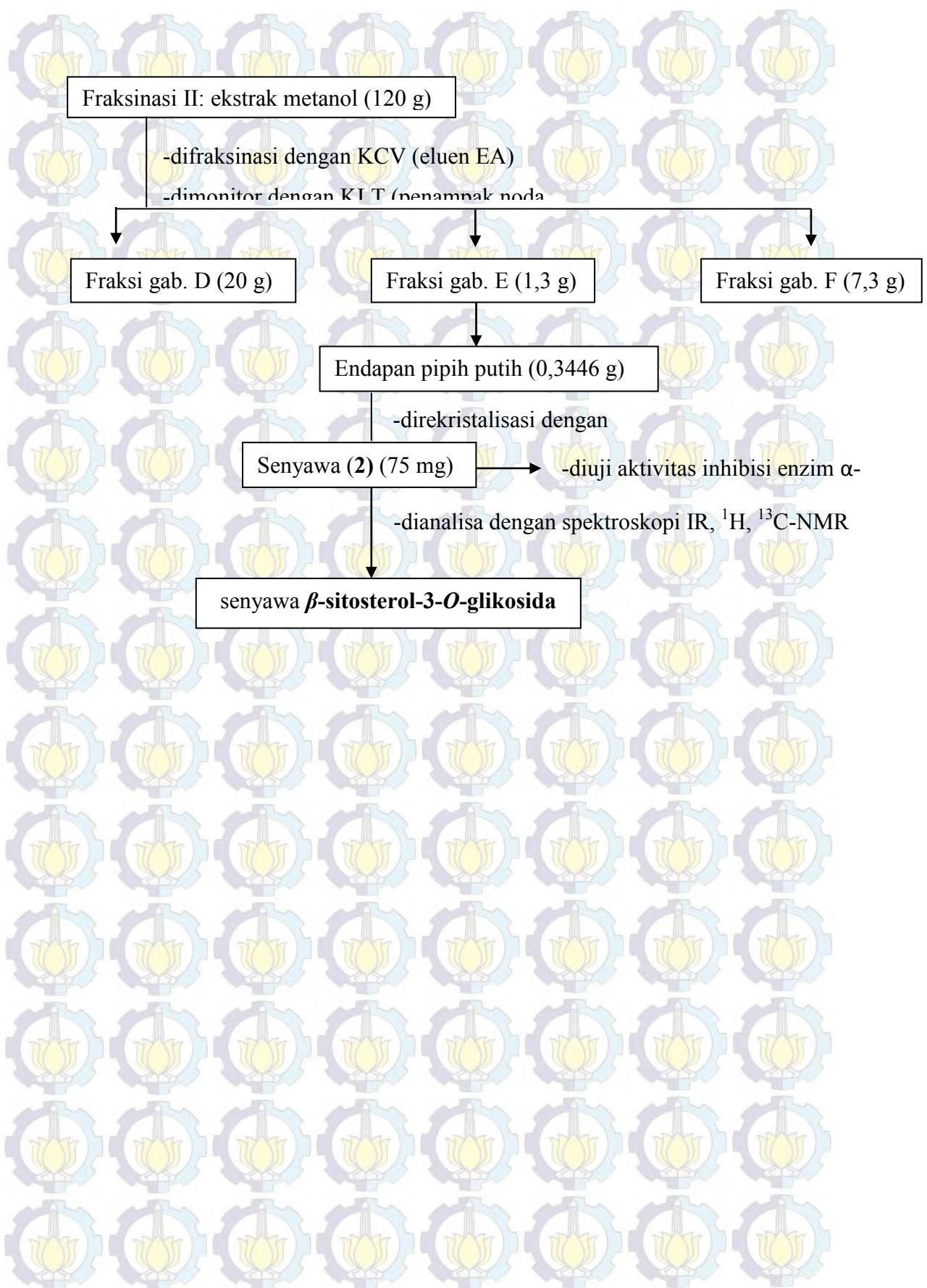
A. SKEMA KERJA

Bagan Alir Penelitian



Ekstraksi dan isolasi senyawa





Uji Aktivitas Inhibisi α -glukosidase

Larutan sampel 10 μL (konsentrasi: 500

- ditambah 25 μl substrat *p*-NPG 0,5 mM
- ditambah 50 μL buffer fosfat (pH 7,0) 100 mM
- ditambah 25 μL enzim α -glukosidase 0,04 unit/mL
- diinkubasi pada 37 °C selama 30 menit
- reaksi dihentikan dengan 100 μl Na₂CO₃ 200 mM

Hasil reaksi

- diukur dengan spektrometer pada 410 nm
- diukur persen penghambatannya

% Inhibisi

Tabel A.1 Nilai % Inhibisi Ekstrak Metanol

Kons. (ppm)	Abs K(-)	Absorbansi			Absorbansi terkoreksi			% inhibisi		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	0,054	0,864	0,864	0,864	0,810	0,810	0,810	-	-	-
25	0,055	0,756	0,745	0,737	0,701	0,690	0,682	13,457	14,815	15,802
50	0,056	0,689	0,695	0,678	0,633	0,639	0,622	21,852	21,111	23,210
100	0,059	0,553	0,565	0,560	0,494	0,506	0,501	39,012	37,531	38,148

Tabel A.2 Nilai % Inhibisi Standar Akarbosa (45)

Kons. (ppm)	Abs K(-)	Absorbansi		Absorbansi terkoreksi		% inhibisi	
		1	2	1	2	1	2
0	0,055	0,582	0,586	0,527	0,531	-	-
0,1	0,057	0,450	0,467	0,393	0,410	25,427	22,787
0,5	0,059	0,266	0,241	0,207	0,182	60,721	65,725
1	0,059	0,163	0,153	0,104	0,094	80,266	82,298
5	0,059	0,095	0,098	0,036	0,039	93,169	92,655
10	0,059	0,081	0,081	0,022	0,022	95,825	95,857

Tabel A.3. Nilai % Inhibisi Senyawa (1)

Kons. (ppm)	Abs K(-)	Absorbansi			Absorbansi terkoreksi			% inhibisi		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	0,059	0,853	0,831	0,832	0,853	0,772	0,773	-	-	-
10	0,059	0,833	0,804	0,804	0,774	0,745	0,745	9,261	3,497	3,622
50	0,062	0,798	0,760	0,739	0,736	0,698	0,677	13,716	9,585	12,419
100	0,058	0,763	0,668	0,678	0,705	0,610	0,620	17,351	20,985	19,793
200	0,058	0,698	0,664	0,624	0,640	0,606	0,566	24,971	21,503	26,779
400	0,077	0,715	0,684	0,648	0,638	0,607	0,571	25,205	21,373	26,132
600	0,099	0,693	0,666	0,626	0,594	0,567	0,527	30,363	26,554	31,824

Tabel A.4. Nilai % Inhibisi Senyawa (2)

Kons. (ppm)	Abs K(-)	Absorbansi			Absorbansi terkoreksi			% inhibisi		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	0,058	0,853	0,831	0,832	0,853	0,773	0,774	-	-	-
10	0,059	0,973	0,933	0,917	0,914	0,874	0,858	-7,151	-13,066	-10,853
50	0,062	0,998	0,946	0,915	0,936	0,884	0,853	-9,730	-14,360	-10,207
100	0,065	0,956	0,873	0,857	0,891	0,808	0,792	-4,455	-4,528	-2,326
200	0,071	0,915	0,861	0,839	0,844	0,790	0,768	1,055	-2,199	0,775
400	0,079	0,915	0,875	0,865	0,836	0,796	0,786	1,993	-2,975	-1,550
600	0,085	0,908	0,865	0,855	0,823	0,780	0,770	3,517	-0,906	0,517

Keterangan: nilai rerata % inhibisi dari senyawa (2) negatif (kecuali pada 600 ppm), sehingga diasumsikan tidak aktif atau memiliki nilai % inhibisi 0 pada Gambar 4.17 (b)

Tabel A.5. Nilai % Inhibisi Standar Akarbosa (45)

Kons. (ppm)	Abs K(-)	Absorbansi			Absorbansi terkoreksi			% inhibisi		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	0,057	0,659	0,678	0,636	0,602	0,621	0,579	-	-	-
0,1	0,058	0,529	0,533	0,534	0,471	0,475	0,476	21,761	23,510	17,789
0,5	0,058	0,274	0,260	0,278	0,216	0,202	0,220	64,120	67,472	62,003
1	0,058	0,204	0,210	0,205	0,146	0,152	0,147	75,748	75,523	74,611
5	0,058	0,108	0,107	0,105	0,050	0,049	0,047	91,694	92,110	91,883
10	0,057	0,093	0,088	0,093	0,036	0,031	0,036	94,020	95,008	93,782

Keterangan:

K(-): kontrol negatif sampel (substrat + sampel)

Contoh perhitungan

% inhibisi dari Akarbosa 0,1 ppm ulangan 1

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{Absorbans terkoreksi blanko} - \text{Absorbans terkoreksi sampel})}{\text{Absorbans terkoreksi blanko}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(0,659 - 0,057) - (0,529 - 0,058)}{0,659 - 0,057} \times 100 \% = 21,761\%$$

B. SPEKTRUM NMR

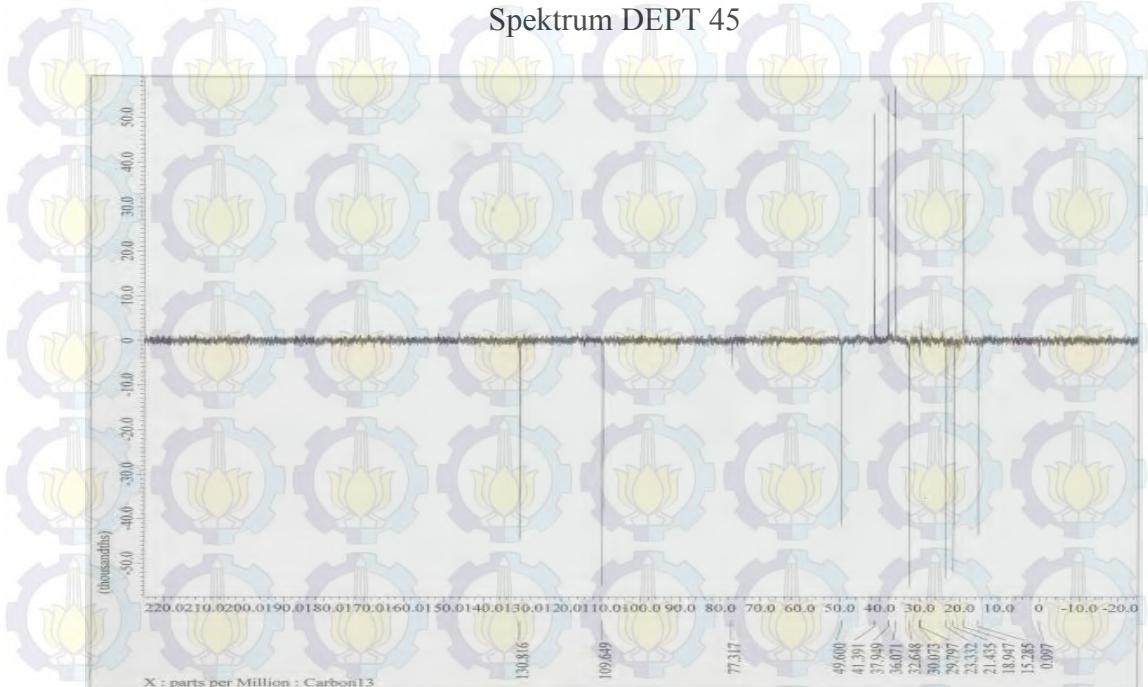
Spektrum NMR senyawa 1

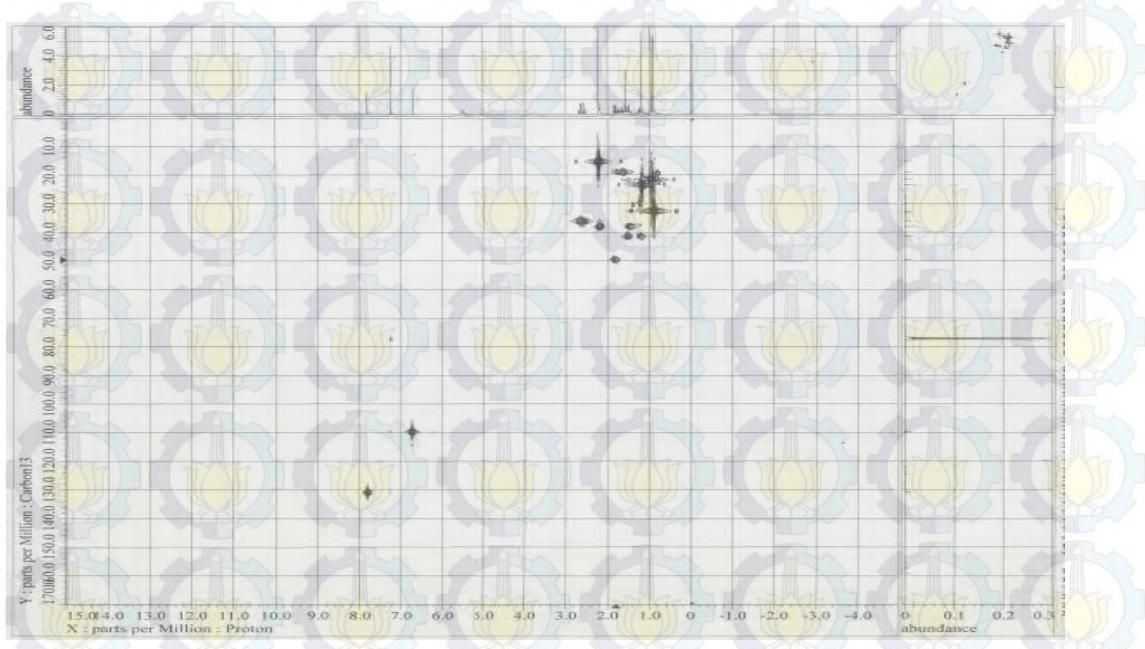


Spektrum ¹H-NMR

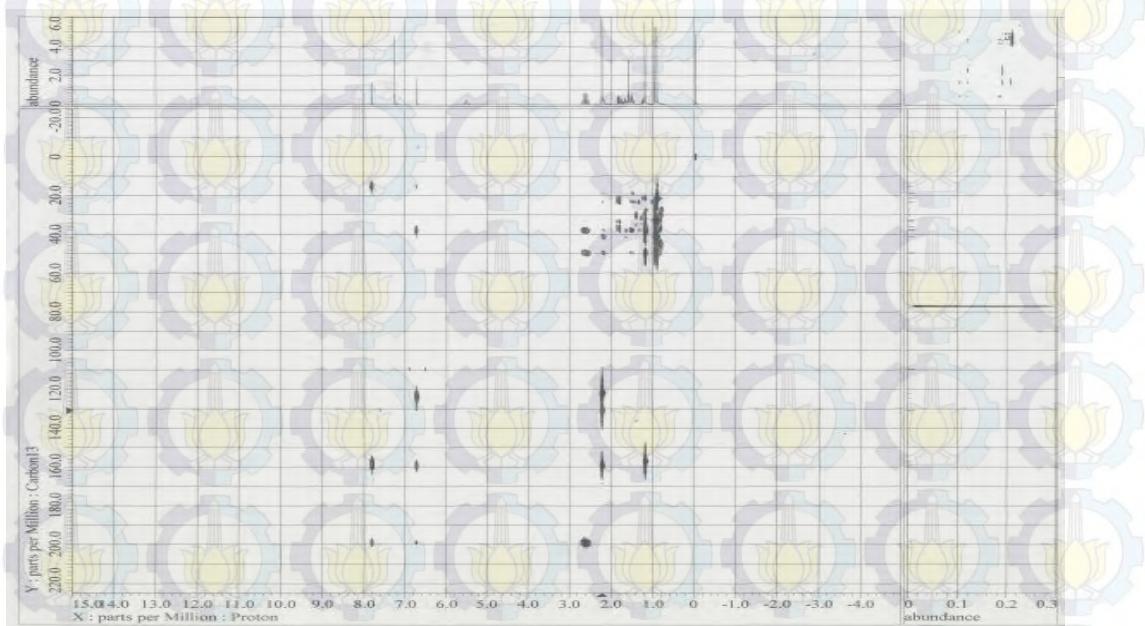


Spektrum ¹³C-NMR



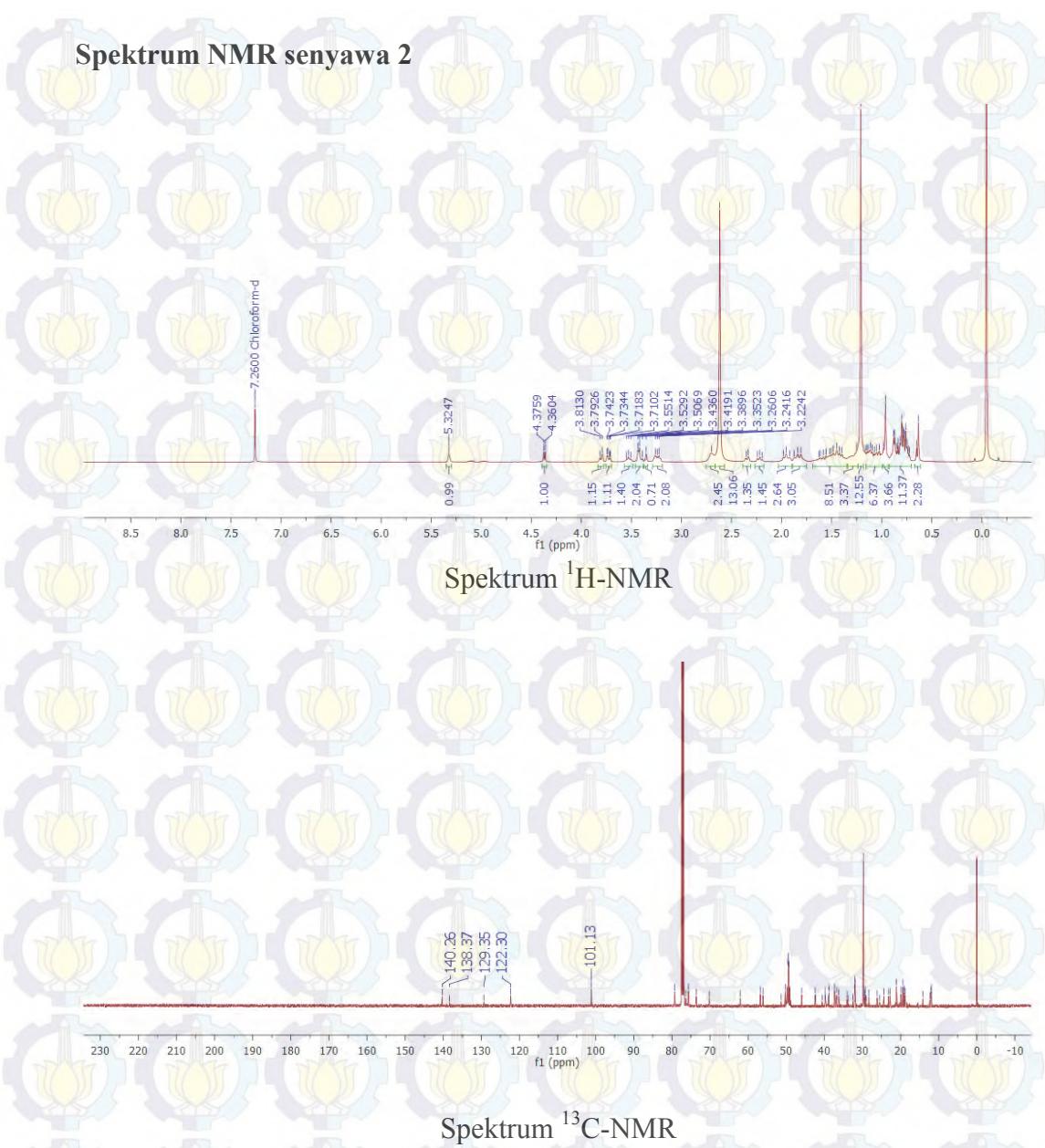


Spektrum HMQC



Spektrum HMBC

Spektrum NMR senyawa 2



Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$

BIOGRAFI PENULIS



Penulis memiliki nama lengkap Wahyu Nugroho dilahirkan pada tanggal 31 Maret 1980 di Pekalongan, Jawa Tengah. Penulis adalah anak ke-6 dari pasangan Amad dan Ruliyah. Riwayat pendidikan penulis dimulai dari SDN Karangsari (1986-1992), SMPN 1 Bojong (1992-1995), SMUN 1 Kajen (1995-1998), S-1 Kimia di Institut Pertanian Bogor (1998-2004). Selanjutnya penulis menempuh Program Magister (S2) di Kimia FMIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya (2012-2015) dalam bidang keahlian Kimia Hayati. Penulis bekerja sebagai staf pengajar di Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Universitas Palangka Raya sejak 2005.