

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Ekstraksi Batang Pucuk Idat

Pembuatan ekstrak batang pucuk idat dilakukan dengan metode maserasi. Metode maserasi baik digunakan dalam mengekstraksi tumbuhan untuk mendapatkan komponen senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak batang pucuk idat. Proses maserasi dilakukan dengan menggunakan pelarut aseton. Aseton merupakan pelarut yang bersifat semi polar. Pemilihan pelarut aseton dapat menarik senyawa bioaktif yang bersifat polar, semi polar hingga non-polar.

Berdasarkan literatur ekstraksi menggunakan pelarut aseton bersifat semi polar dapat mengekstrak senyawa dengan kepolaran yang berbeda, tujuannya agar dapat mengekstrak metabolit sekunder yang lebih aktif (Arrisujaya, 2019). Ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator* bertujuan untuk menguapkan pelarut pada ekstrak sehingga menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak batang pucuk idat dihasilkan sebanyak 100,18 gram dan rendemen yang dihasilkan sebesar 5%.

### 4.2 Hasil Fraksinasi Ekstrak Batang Pucuk Idat

Sebanyak 50 gram ekstrak batang pucuk idat dilakukan fraksinasi cair-cair menggunakan pelarut metanol:air, n-heksan dan etil asetat. Hasil fraksinasi cair-cair masing-masing jenis pelarut dapat dilihat pada tabel 4.1 sebagai berikut:

Tabel 4.1 Berat Fraksi Batang Pucuk Idat

N-heksan	Etil asetat	Metanol:Air
2,25 gram	12,80 gram	26,28 gram

Hasil berat tertinggi pada fraksi batang pucuk idat pada tabel 4.1 adalah fraksi metanol:air dengan berat 26,28 gram diikuti dengan fraksi etil asetat sebesar 12,80 gram dan n-heksan 2,25 gram. Jumlah ekstrak yang terfraksi oleh masing-masing pelarut berbeda, hal ini dikarenakan komponen senyawa yang terdapat didalam ekstrak batang pucuk idat lebih tertarik ke dalam pelarut polar hingga ke semi polar. Jumlah fraksi n-heksan memiliki jumlah rendemen yang relatif kecil. Hal ini disebabkan oleh sedikitnya jumlah kandungan senyawa yang bersifat non-polar, sehingga ekstrak batang pucuk idat lebih cenderung ke dalam senyawa

polar. Harapannya kandungan senyawa yang terdapat di ekstrak batang pucuk idat berupa senyawa golongan fenolik dan flavonoid yang digunakan sebagai senyawa aktif dalam berperan sebagai antioksidan dan antidiabetes.

### 4.3 Identifikasi Fitokimia

Analisis skrining fitokimia dilakukan secara kualitatif golongan senyawa yang terdapat dalam sampel. Analisis fitokimia bertujuan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam sampel batang pucuk idat. Skrining fitokimia dilakukan pada ekstrak dan fraksi batang pucuk idat yang menunjukkan adanya keberadaan beberapa senyawa yang aktif. Pengujian fitokimia ini dilakukan khususnya senyawa fenolik dan flavonoid. Hasil identifikasi senyawa fenolik dan flavonoid dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

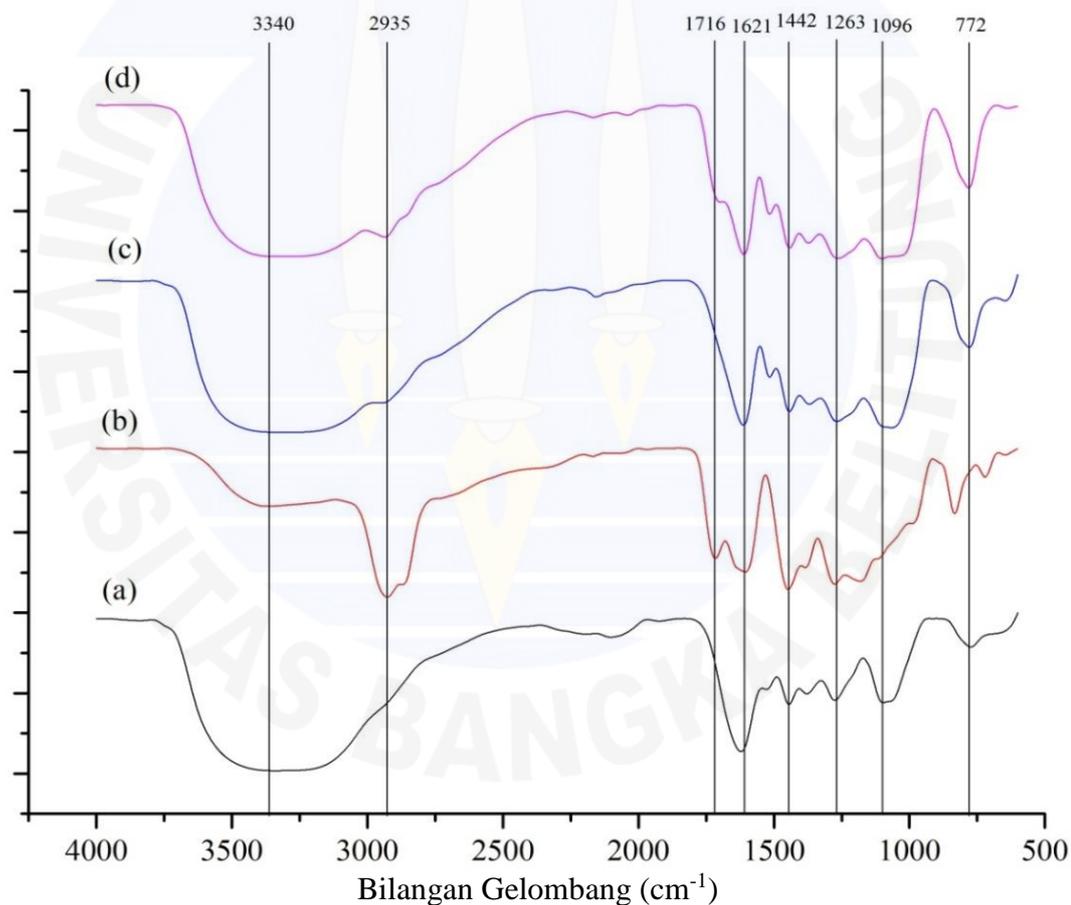
Tabel 4.2 Hasil Uji Skrining Fitokimia Ekstrak dan Fraksi Batang Pucuk idat

No	Sampel Uji	Uji Fitokimia	Jenis Pereaksi	Hasil	Keterangan
1	Ekstrak	Fenolik	FeCl <sub>3</sub>	Terbentuk Warna Hijau Tua	+
		Flavonoid	Uji Wilstatur Sianidin	Terbentuk Warna Jingga	+
2	Fraksi Metanol:Air	Fenolik	FeCl <sub>3</sub>	Terbentuk warna Hijau Tua	+
		Flavonoid	Uji Wilstatur Sianidin	Terbentuk Warna Jingga	+
3	Fraksi N-heksan	Fenolik	FeCl <sub>3</sub>	Tidak Ada Perubahan	+
		Flavonoid	Uji Wilstatur Sianidin	Terbentuk Warna Jingga	+
4	Fraksi Etil asetat	Fenolik	FeCl <sub>3</sub>	Terbentuk Warna Hijau Tua	+
		Flavonoid	Uji Wilstatur Sianidin	Terbentuk Warna Jingga	+

Berdasarkan tabel 4.2 menunjukkan bahwa ekstrak batang pucuk idat, fraksi metanol:air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan positif mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Hal ini disebabkan karena ekstrak batang pucuk idat, fraksi metanol:air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan berpotensi mengekstraksi senyawa sebagai antioksidan dan antidiabetes.

#### 4.4 Analisis Data FT-IR

Analisis FT-IR dilakukan untuk menentukan gugus fungsi yang ditunjukkan dengan adanya serapan pada bilangan gelombang tertentu dengan memberikan serapan yang berbeda pada setiap sampel. Hasil FT-IR dapat dilihat sebagai berikut:



Gambar 4.1 Spektrum FT-IR : (a) Ekstrak Batang Pucuk Idat, (b) Fraksi N-heksan, (c) Fraksi Etil asetat (d) Fraksi Metanol:Air.

Berdasarkan hasil FT-IR ekstrak dan fraksi batang pucuk idat menunjukkan adanya keberadaan dari beberapa gugus fungsi. Hasil tersebut dianalisis bilangan gelombangnya dengan gugus fungsi yang disajikan pada tabel 4.3 berikut ini:

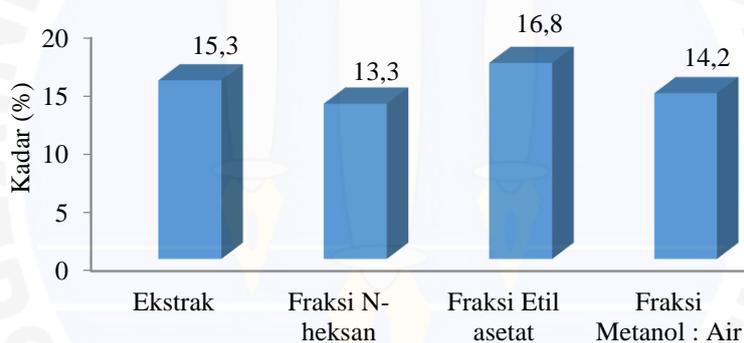
Tabel 4.3 Hasil Data FT-IR Ekstrak dan Fraksi Batang Pucuk Idat

Gugus Fungsi	Bentuk Pita	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )			
		Ekstrak	Fraksi	Fraksi	Fraksi
			N-heksan	Etil asetat	Metanol:Air
O-H ulur	Melebar	3341	3367	3322	3340
C-H (pada CH <sub>3</sub> ) ulur	Tajam	-	2925	2900	2935
C=O ulur	Tajam	-	1716	-	1700
C=C ulur	Tajam	1621	1605	1612	1610
C-H (pada CH <sub>2</sub> ) tekuk	Tajam	1444	1447	1442	1442
C-O ulur	Tajam	1275	1275	1267	1263
C-O ulur	Tajam	1096	1180	1064	1102
C-H tekuk	Tajam	772	832	778	781

Hasil analisis spektrofotometri FT-IR pada serapan melebar daerah bilangan gelombang diindikasikan sebagai gugus O-H berkisar 3000-3600 cm<sup>-1</sup>. Gugus C-H ulur berada kisaran 2850-2960 cm<sup>-1</sup>. Gugus C=O ulur berkisar 1700-1780 cm<sup>-1</sup>. Gugus C=O adalah ciri khas dari senyawa flavonoid yang terdapat pada spektrum b dan d. Gugus C=C ulur antara 1500-1680 cm<sup>-1</sup>. Gugus C-H tekuk antara 1350-1470 cm<sup>-1</sup>. Gugus C-O ulur berkisar 1060-1300 cm<sup>-1</sup>. Sedangkan C-H tekuk dimana gugus ini berkisar pada bilangan gelombang antara 675-870 (Rahmi, 2016). Berdasarkan hasil gugus fungsi yang telah dianalisis fraksi batang pucuk idat muncul serapan bilangan gelombang yang diindikasikan sebagai C-H ulur sedangkan ekstrak tidak muncul pada serapan bilangan gelombang tersebut. Hal ini dikarenakan ekstrak masih banyak kandungan senyawa yang belum terpisah dari senyawa non-polar hingga polar. Fraksi n-heksan dan metanol:air memiliki gugus fungsi C=O yang diindikasikan bahwa fraksi n-heksan dan metanol:air mengandung senyawa flavonoid. Sedangkan ekstrak dan fraksi etil asetat tidak muncul serapan bilangan gelombang. Hal ini berarti dilihat dari spektrum ekstrak dan fraksi etil asetat diduga mengandung senyawa fenolik.

#### 4.5 Penentuan Kadar Total Fenolik

Pengujian kadar total fenolik dilakukan untuk menentukan jumlah senyawa fenolik yang terdapat di dalam sampel sebagai dasar untuk pengujian aktivitas antioksidan dan antidiabetes. Larutan standar dalam penentuan kadar total fenolik adalah asam galat. Penggunaan asam galat karena salah satu senyawa fenol alami. Pengukuran total fenolik menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu. Asam galat yang direaksikan dengan Folin-Ciocalteu membentuk warna kuning kemudian akan terjadi perubahan warna menjadi biru setelah penambahan natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Tingginya intensitas warna biru yang dihasilkan setara dengan banyaknya kandungan senyawa fenolik, sehingga semakin tinggi kandungan senyawa fenolik dalam sampel semakin pekat warna biru yang dihasilkan (Apsari, 2011). Kandungan total fenolik pada sampel dihasilkan nilai absorbansi dalam persamaan kerva standar dari asam galat. Sehingga dari hasil analisa kadar total fenolik dapat disajikan pada gambar berikut ini:

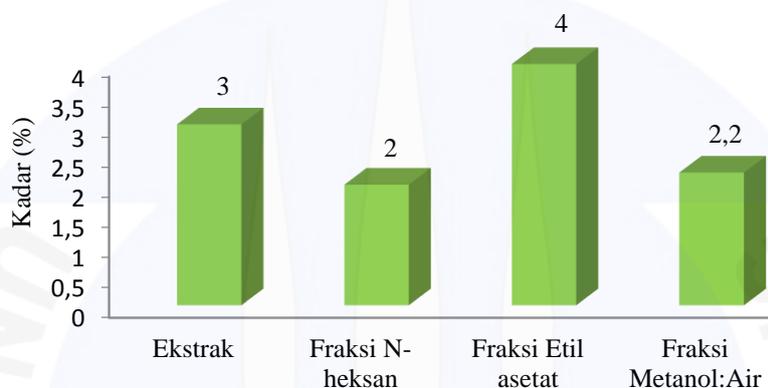


Gambar 4.2 Kadar Total Fenolik pada Sampel

Hasil penentuan kadar total fenolik menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki jumlah kandungan fenolik total yang paling tinggi yaitu sebesar 16,8%. Jumlah kandungan fenolik total pada ekstrak mempunyai jumlah kadar sebesar 15,3%. Kadar total fenolik pada fraksi metanol:air mempunyai jumlah kandungan fenolik sebesar 14,2%. Sedangkan jumlah kandungan fenolik total pada fraksi n-heksan relatif rendah dibandingkan dari ketiga sampel yaitu dengan kadar 13,3%. Hal ini mengacu pada penelitian nur (2019), bahwa fraksi etil asetat mengandung kadar total fenolik tertinggi jika dibandingkan fraksi n-heksan. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa senyawa fenolik banyak terdapat pada pelarut yang semi polar yaitu fraksi etil asetat.

#### 4.6 Penentuan Kadar Total Flavonoid

Analisis kadar total flavonoid pada sampel dilakukan dalam pengukuran absorbansi yang diukur dalam menentukan jumlah kandungan yang terdapat di dalam ekstrak dan fraksi batang pucuk idat menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 420 nm dengan warna yang terbentuk adalah warna kuning. Tingginya intensitas warna kuning yang terbentuk maka hal ini perbandingan lurus dengan tingginya konsentrasi (Chotimah, 2019). Total flavonoid. Sehingga dari hasil analisa kadar total flavonoid dapat disajikan pada gambar berikut ini:



Gambar 4.3 Kadar Total Flavonoid pada Sampel

Berdasarkan gambar 4.3 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki jumlah kandungan flavonoid total yang tertinggi yaitu sebesar 4%. Jumlah kandungan flavonoid total pada ekstrak mempunyai jumlah kadar sebesar 3%. Kadar total flavonoid pada fraksi metanol:air mempunyai jumlah kandungan flavonoid sebesar 2,2%. Sedangkan jumlah kandungan flavonoid total pada fraksi n-heksan paling rendah dibandingkan dari ketiga sampel yaitu dengan kadar 2%. Hal ini juga telah dilakukan penelitian (Fadillah, 2017) bahwa fraksi etil asetat juga mengandung kadar total flavonoid yang tertinggi jika dibandingkan dengan fraksi n-heksan. Oleh karena itu dari penelitian ini senyawa flavonoid banyak terdapat pada pelarut yang semi polar yaitu fraksi etil asetat.

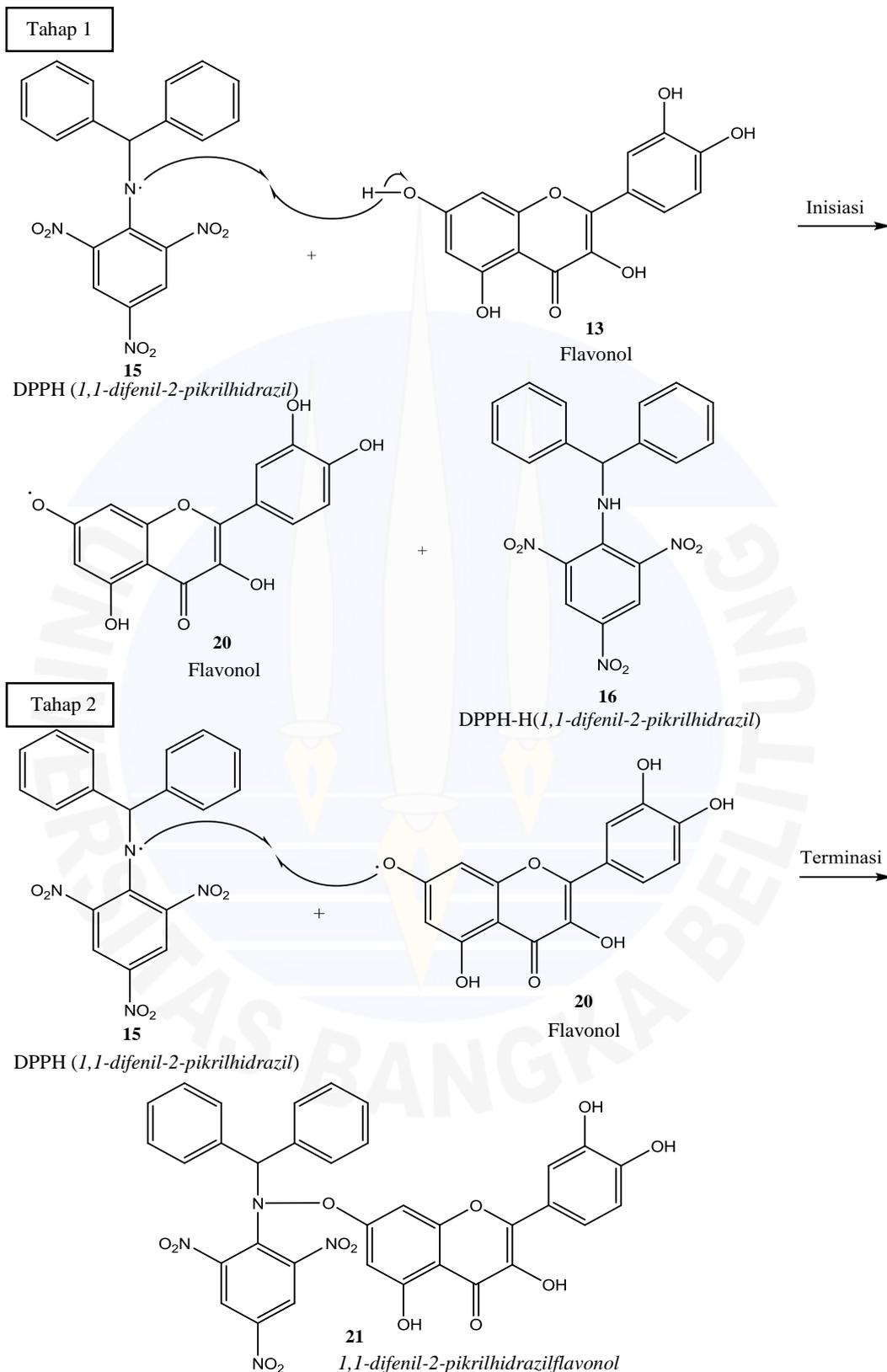
#### 4.7 Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer dengan mengukur inhibisi konsentrasi dengan kemampuan sampel dalam meredam radikal dari DPPH. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*). Mekanisme reaksi DPPH dengan senyawa antioksidan adalah mekanisme reaksi radikal. Penggunaan DPPH merupakan suatu senyawa yang memiliki radikal bebas yang kemudian bereaksi dengan senyawa antioksidan yang dapat berupa senyawa fenolik atau flavonoid membentuk DPPH-H dan radikal antioksidan.

Senyawa yang bereaksi dalam penangkal radikal akan mereduksi DPPH yang akan berpasangan dengan hidrogen dari senyawa antioksidan sehingga membentuk DPPH-H tereduksi (Molynuex, 2004). DPPH dalam bentuk non-radikal akan kehilangan warna ungu yang ditandai pemudaran warna diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer. Langkah awal dilakukan optimasi panjang gelombang maksimum. Berdasarkan literatur panjang gelombang optimum sebesar 515-517 nm. Setelah dilakukan penentuan panjang gelombang yang optimum didapatkan sebesar 515 nm (lampiran 7). Sehingga pengukuran serapan sampel diukur pada panjang gelombang 515 nm.

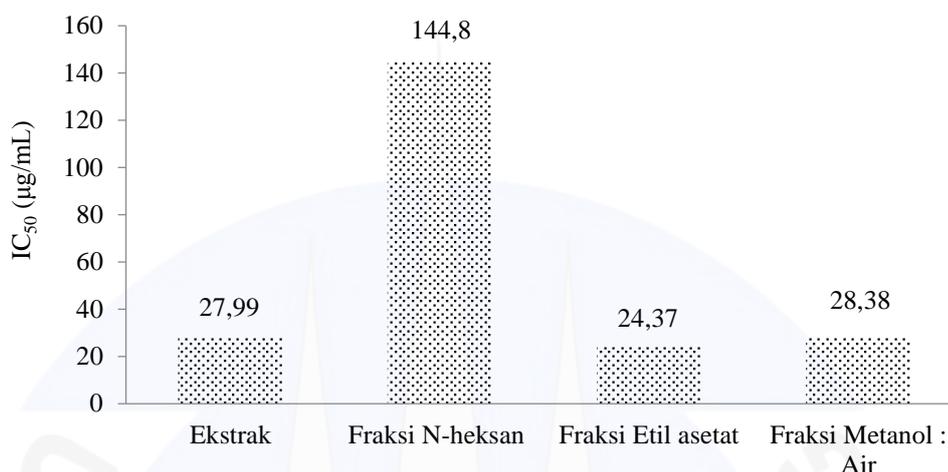
Mekanisme radikal dari DPPH dengan senyawa antioksidan melalui tahap 1 dan tahap 2. Senyawa flavonol (**13**) pada gugus OH akan memberikan suatu atom yaitu atom hidrogen akan diambil oleh radikal dari DPPH yang akan membentuk radikal dari antioksidan yang stabil. Tahap 1 Senyawa DPPH (**15**) radikal mengikat H pada senyawa flavonol (**13**) sehingga senyawa flavonol menjadi O radikal (**20**) dan DPPH menjadi stabil (**16**). Kemudian tahap 2 senyawa DPPH radikal (**15**) mengikat O radikal senyawa flavonol (**20**) sehingga menghasilkan produk *1,1-difenil-2-pikrilhidrazilflavonol* (**21**).

Mekanisme reaksi radikal DPPH dengan senyawa antioksidan dapat dilihat gambar 4.4 berikut ini:



Gambar 4.4 Mekanisme Reaksi DPPH dengan Antioksidan (Molynuex, 2004).

Penambahan sampel pada uji antioksidan menyebabkan perubahan warna dari DPPH akan menghasilkan warna kuning. Hal ini dapat menurunkan nilai absorbansi dari peredaman radikal bebas oleh DPPH. Tingginya aktivitas antioksidan maka absorbansi yang diperoleh akan semakin rendah. Hasil analisis dari uji antioksidan dapat dilihat gambar 4.5 berikut ini:

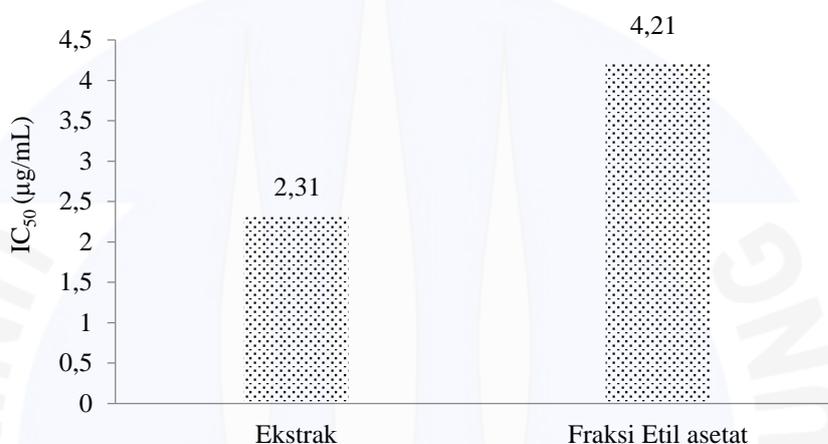


Gambar 4.5 Grafik Aktivitas Antioksidan

Berdasarkan gambar 4.5 hasil analisis uji aktivitas antioksidan fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antioksidan paling kecil nilai IC<sub>50</sub> dibandingkan dengan yang lainnya. Fraksi etil asetat diperoleh nilai IC<sub>50</sub> sebesar 24,37 µg/mL. Hal ini menunjukkan adanya korelasi antara kadar total fenolik dan flavonoid dengan aktivitas antioksidan. Berdasarkan pengujian total fenolik yang dilakukan fraksi etil asetat memiliki jumlah kandungan total fenolik tertinggi sehingga memberikan aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Ekstrak batang pucuk idat mempunyai aktivitas antioksidan dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 27,99 µg/mL. Aktivitas antioksidan pada fraksi metanol:air mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Fraksi metanol:air memberikan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 28,38 µg/mL. Sedangkan pada fraksi n-heksan mempunyai aktivitas antioksidan yang sedang dengan memberikan nilai IC<sub>50</sub> yaitu 144,80 µg/mL. Hasil tersebut juga menyatakan pada penelitian Dwiatun (2018), pada fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antioksidan yang tertinggi jika dibandingkan dengan fraksi n-heksan dan fraksi air. Hal ini dikarenakan pada fraksi etil asetat terdapat senyawa flavonoid yang dapat menghambat aktivitas radikal DPPH (Redha, 2010).

#### 4.8 Uji Aktivitas Antidiabetes

Uji aktivitas antidiabetes dilakukan secara *in-vitro* melalui penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase. Prinsip pengukuran penghambatan enzim alfa glukosidase yaitu sampel uji dan substrat *p*-nitrophenol- $\alpha$ -D-glukopiranosida (p-NPG) diinkubasi dan direaksikan dengan enzim  $\alpha$ -glukosidase. Hasil analisis aktivitas antidiabetes pada ekstrak batang pucuk idat dan fraksi etil asetat ternyata mampu menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase. Aktivitas antidiabetes dalam menghambat  $\alpha$ -glukosidase dengan nilai  $IC_{50}$  disajikan gambar 4.6 sebagai berikut:



Gambar 4.6 Aktivitas Antidiabetes Inhibitor  $\alpha$ -Glukosidase

Berdasarkan gambar 4.6 menunjukkan bahwa aktivitas antidiabetes melalui inhibitor  $\alpha$ -glukosidase pada ekstrak dan fraksi etil asetat mempunyai aktivitas yang sangat kuat dengan  $IC_{50}$  berturut-turut yaitu 2,31  $\mu\text{g/mL}$  dan 4,21  $\mu\text{g/mL}$ . Hal ini juga dilakukan pada penelitian Kissinger (2015), aktivitas antidiabetes  $\alpha$ -glukosidase ekstrak metanol batang kulit irat (*Cratoxylum arborescens*) memiliki nilai  $IC_{50}$  5,23  $\mu\text{g/mL}$ . Penelitian baru yang dilakukan oleh Arsakit (2020), aktivitas antidiabetes ekstrak batang *Cratoxylum formosum* subsp memiliki  $IC_{50}$  31,1  $\mu\text{g/mL}$ . Hasil penelitian disimpulkan bahwa ekstrak dan fraksi batang pucuk idat (*Cratoxylum glaucum*) terhadap aktivitas antidiabetes nilai  $IC_{50}$  lebih kecil dibandingkan pada penelitian Kissinger dan Arsakit. Tumbuhan batang pucuk idat menempati posisi yang terbaik sebagai aktivitas antidiabetes, sehingga dapat disajikan tabel berikut ini:

Tabel 4.4 Studi Tumbuhan sebagai Aktivitas Antidiabetes

No	Sampel	Aktivitas Antidiabetes (IC <sub>50</sub> )	Pustaka
1	Ekstrak Batang Pucuk Idat ( <i>Cratoxylum glaucum</i> )	2,31 µg/mL	Penelitian ini
2	Fraksi Etil asetat Batang Pucuk Idat ( <i>Cratoxylum glaucum</i> )	4,21 µg/mL	Penelitian ini
3	Kulit Irat ( <i>Cratoxylum arborescens</i> )	5,23 µg/mL	Kissinger, 2015
4	Ekstrak Batang <i>Cratoxylum formosum</i> subsp	31,1 µg/mL	Arsakit, 2020

#### 4.9 Korelasi Antara Total Fenolik dan Flavonoid Fraksi Batang Pucuk Idat Terhadap Aktivitas Antioksidan dan Antidiabetes

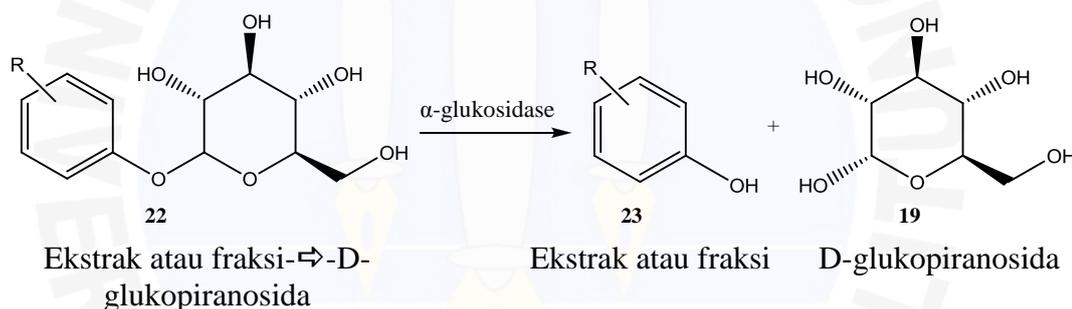
Hasil korelasi antara total fenolik dan flavonoid fraksi batang pucuk idat terhadap aktivitas antioksidan dan antidiabetes dilihat pada tabel 4.5 sebagai berikut:

Tabel 4.5 Total Fenolik dan Flavonoid Fraksi Batang Pucuk Idat Terhadap Aktivitas Antioksidan dan Antidiabetes

Sampel	Total Fenolik (µg/mL)	Total Flavonoid (µg/mL)	Aktivitas Antioksidan (µg/mL)	Aktivitas Antidiabetes (µg/mL)
Ekstrak	153,97	30,75	27,99	2,31
Fraksi Etil asetat	168,22	40,04	24,37	4,21
Fraksi N-heksan	133,97	20,47	144,80	Tidak Diuji
Fraksi Metanol:Air	142,97	22,04	28,38	Tidak Diuji

Berdasarkan tabel 4.5 total fenolik dari masing-masing sampel ketika total fenoliknya tinggi maka aktivitas antioksidannya nilai  $IC_{50}$  lebih kecil. Begitu pula dengan total flavonoid. Ketika total flavonoidnya tinggi maka aktivitas antioksidan nilai  $IC_{50}$  semakin kecil. Hal ini berarti adanya korelasi antara total fenolik dan flavonoid terhadap aktivitas antioksidan.

Ditinjau dari hasil kadar total fenolik dan flavonoid ekstrak dan fraksi etil asetat memiliki korelasi dengan aktivitas antioksidan. Korelasi tersebut hasil fraksi etil asetat lebih baik dari ekstrak. Tetapi dari hasil data antidiabetes nilai  $IC_{50}$  ekstrak lebih kecil dari fraksi etil asetat. Hal ini dikarenakan ekstrak mengandung gugus OH yang terglukosilasi. Sedangkan fraksi etil asetat memiliki gugus OH bebas yang dibuktikan dengan pengujian total fenolik dan flavonoid yang tinggi, sehingga nilai  $IC_{50}$  lebih besar dari ekstrak (Sugiwati, 2009). Reaksi  $\alpha$ -glukosidase dengan senyawa yang terkandung dalam ekstrak atau fraksi etil asetat dilihat dari struktur berikut ini:

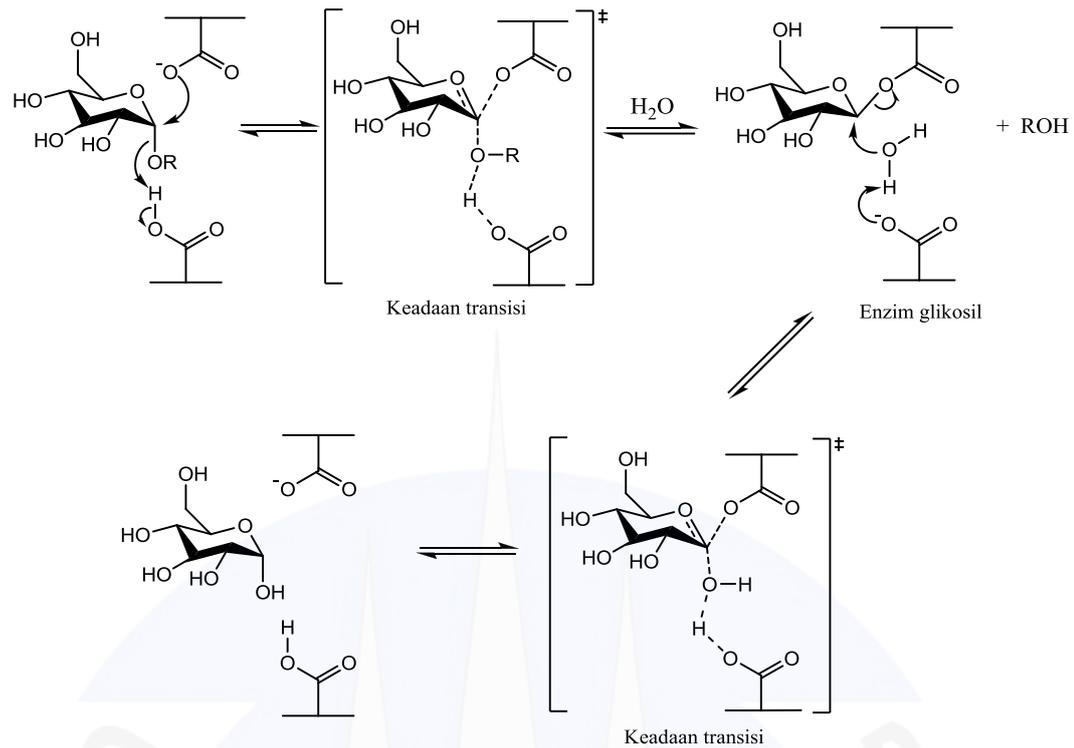


Gambar 4.7 Usulan Reaksi  $\alpha$ -Glukosidase dengan Senyawa yang Terkandung dalam Ekstrak atau Fraksi Etil asetat

Mekanisme inhibisi terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak dan fraksi etil asetat batang pucuk idat memberikan konstituen utama flavonoid. Oleh karena itu dari mekanisme reaksi (gambar 4.8) diperkirakan mekanisme inhibisi untuk ekstrak dan fraksi etil asetat batang pucuk idat mengikuti mekanisme inhibisi senyawa flavonoid. Adapun mekanisme reaksi antara senyawa aktif dengan  $\alpha$ -glukosidase disajikan gambar 4.8 sebagai berikut:

Tahap 1

Tahap 2



Gambar 4.8 Mekanisme Reaksi Antara Senyawa Aktif dengan  $\alpha$ -Glukosidase.

Sumber: (Sukandar, 2012)

Mekanisme kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan senyawa aktif dilakukan dengan dua mekanisme reaksi. Tahap pertama adalah glikosilasi yang merupakan peran sebagai nukleofil, sehingga dapat menyerang kepusat anomernya untuk dapat mengubah suatu aglikon yang dapat membentuk enzim glikosil. Residu yang lainnya berperan sebagai katalis asam dan mengalami protonasi oleh oksigen glikosidik. Tahap yang kedua yaitu deglikosilasi oleh enzim glikosil yang akan dihidrolisis oleh air. Kemudian residu yang lainnya berfungsi sebagai katalis basa sehingga mengalami deprotonasi oleh air ketika penyerangan oleh zat aktif.